

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 9 月 18 日 (18.09.2003)

PCT

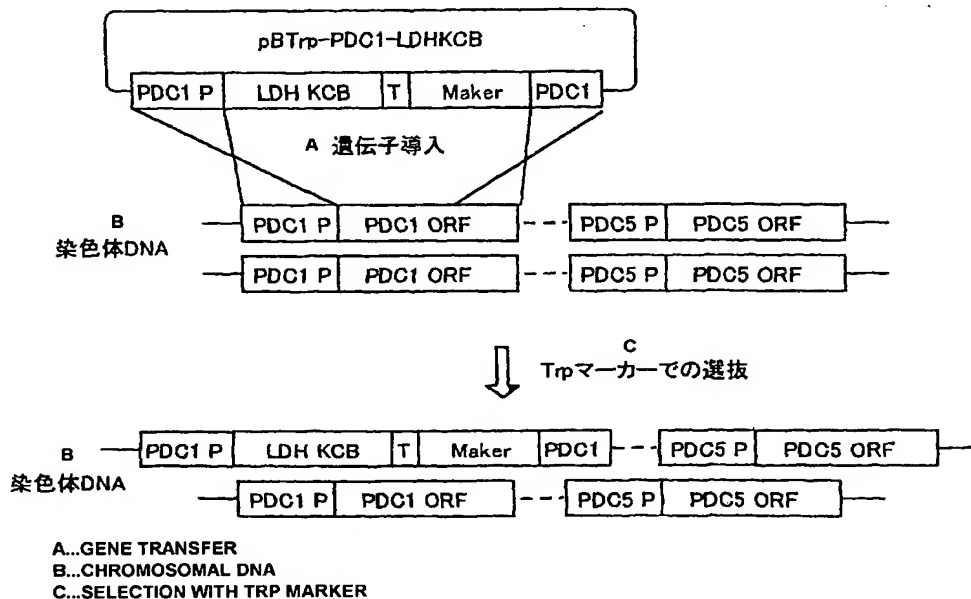
(10) 国際公開番号
WO 03/076630 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/53, KAISHA) [JP/JP]; 〒471-8571 愛知県 豊田市トヨタ町 1 Aichi (JP).
9/14, C12P 7/50, C12N 1/15
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02833
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 11 日 (11.03.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-065880 2002 年 3 月 11 日 (11.03.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): トヨタ自動車株式会社 (TOYOTA JIDOSHA KABUSHIKI)
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 齋藤 聡志 (SAITO, Satoshi) [JP/JP]; 〒471-8571 愛知県 豊田市トヨタ町 1 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 早乙女理 (SAOTOME, Osamu) [JP/JP]; 〒471-8571 愛知県 豊田市トヨタ町 1 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 保谷 典子 (YASUTANI, Noriko) [JP/JP]; 〒471-8571 愛知県 豊田市トヨタ町 1 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 松尾 康生 (MATSUO, Yasuo) [JP/JP]; 〒471-8571 愛知県 豊田市トヨタ町 1 トヨタ自動車株式会社内 Aichi (JP). 石田 亘広 (ISHIDA, Nobuhiro) [JP/JP]; 〒480-1192 愛知県 愛知郡長久手町 大字長

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF CONTROLLING ETHANOL PRODUCTION AND MASS PRODUCTION OF LACTIC ACID AND TRANSFORMANT THEREFOR

(54) 発明の名称: エタノール生産制御方法



(57) Abstract: It is intended to provide a transformant carrying a DNA, which encodes a foreign protein having a lactate dehydrogenase activity and exhibiting such an affinity for a pyruvic acid substrate as being comparable or even exceeding the affinity for a pyruvic acid substrate of the intrinsic pyruvate decarboxylase in the host, transferred thereinto. Using this transformant, lactic acid can be stably produced in a large amount in a host having a pyruvate decarboxylase gene.

(57) 要約: 本発明によれば、宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAが導入されている形質転換体が

[続葉有]



湫字横道 4 1 番地の 1 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP). 平井 正名 (HIRAI,Masana) [JP/JP]; 〒480-1192 愛知県 愛知郡長久手町 大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP). 今枝 孝夫 (IMAEDA,Takao) [JP/JP]; 〒480-1192 愛知県 愛知郡長久手町 大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP). 宮崎力 (MIYAZAKI,Chikara) [JP/JP]; 〒480-1192 愛知県 愛知郡長久手町 大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP). 徳弘 健郎 (TOKUHIRO,Kenro) [JP/JP]; 〒480-1192 愛知県 愛知郡長久手町 大字長湫字横道 4 1 番地の 1 株式会社豊田中央研究所内 Aichi (JP).

(74) 代理人: 岡田 英彦, 外(OKADA,Hidehiko et al.); 〒460-0008 愛知県 名古屋市中区 栄2丁目10番19号 名古屋商工会議所ビル Aichi (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,

ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

提供される。当該形質転換体によれば、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子を有する宿主生物中で乳酸を安定的に大量生産させることができるようになる。

明細書

エタノール生産制御方法

5 【0001】

技術分野

この発明は、エタノールの生産制御及び乳酸の高生産技術に関し、詳しくは、酵母における乳酸生産に適した高発現系に関する。

【0002】

10 背景技術

組換えDNA技術の進歩により、微生物、カビ、動植物および昆虫などの宿主で外来遺伝子を発現させ、その形質転換体を増殖させることによって、目的遺伝子産物を取得する技術が発展してきた。例えば、酵母などの培養によれば、発酵生産により大量の目的遺伝子産物を生産させることも可能である。

15 【0003】

これまで、酵母によってL-乳酸を生産させようとする試みはいくつか存在している。ウシ由来の乳酸脱水素酵素(LDH)遺伝子を酵母サッカロマイセス・セレビシエに導入し、L-乳酸を生産させる試みがある(Eri Adahi et al., "Modification of metabolic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate genes for the lactic acid fermentation at low pH value", J. Ferment. Bioeng. Vol.86, No.3, 284-289, 1988、Danio Porro et al., "Development of metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* cells for the production of lactic acid", Biotechnol.Prog. Vol.11, 294-298, 1995, 特表2001-516584号公報)。しかしながら、いずれの報告においても、L-乳酸の高生産は認められていない。

25

【0004】

サッカロマイセス・セレビシエにおけるピルビン酸脱炭酸酵素は、複数のアイソザイムを持つことが知られており、通常の酵母においては、ピルビン酸脱炭酸酵素1が機能しており、本遺伝子などの破壊が原因でこのタンパク質が発現しな

い状態となると、ピルビン酸脱炭酸酵素 5 が機能し、エタノール生産が維持される機構を備えている ("Autoregulation of yeast pyruvate decarboxylase gene expression requires the enzyme but not its catalytic activity", Ines Eberhardt, Hakan Cederberg, Haijuan Li, Stephan Koning, Frank Jordan and Stephan Hohmann, Eur. J. Biochem. Vol.262, 191-201, 1999)。

【 0 0 0 5 】

発明の開示

このように、サッカロマイセス・セレピシエ中で L-乳酸を高生産させる技術は完成していなかった。

- 10 本発明の一つの目的は、酵母サッカロマイセス・セレピシエなどのピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子を有する宿主生物中でエタノール生産を制御し乳酸を安定的に大量生産させる技術を提供することである。

【 0 0 0 6 】

- 15 本発明者らは、サッカロマイセス・セレピシエ中での乳酸生産させる場合に発現させる乳酸脱水素酵素 (LDH) について着目して検討したところ、宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA が導入されている形質転換体が乳酸生産に有効であることを見出した。ピルビン酸は、エタノール生産に繋がるピルビン酸脱炭酸
- 20 酵素と乳酸生産を触媒する乳酸脱水素酵素などの共通の基質である。ここで、本形質転換体においては、乳酸脱水素酵素の方がピルビン酸脱炭酸酵素よりもピルビン酸に対する基質親和性が高いので、ピルビン酸脱炭酸酵素によって触媒されるエタノール生産が抑制され、外来の乳酸脱水素酵素による乳酸生産が促進される。これにより、形質転換体による乳酸生産を増大させることができる。

25 【 0 0 0 7 】

以上のことから、以下の発明を開示することができる。

本発明の一つの側面は、宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA が導入されて

いる形質転換体として開示される。本形質転換体において、前記外来タンパク質をコードするDNAは、宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制御可能に導入されている形質転換体も提供される。

- 5 本発明の形質転換体における前記外来タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログであることが好ましい。このタンパク質は、特に、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質かあるいはそのホモログとすることが有用である。また、当該タンパク質は、配列番号3に示すDNA配列によってコードされていることが好ましい。このDNA配列は、配列番号4に示すDNA配列として形質転換体に保有されていることが好ましい。

前記宿主染色体上のプロモーターは、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子プロモーターであることが好ましい形態である。また、このプロモーターとしては、配列番号2に示すDNA配列あるいはそのホモログを利用することが好ましい。

- 15 本形質転換体において、前記宿主生物は、サッカロマイセス属であることが好ましく、より好ましくは、サッカロマイセス・セレビシエである。

本発明の他の側面は、本形質転換体を培養する工程と、前記工程で得られる培養物から乳酸を分離する工程、とを備える、乳酸の製造方法として開示される。この方法によれば、安定的に効率よく乳酸を製造することができる。

【0008】

20 図面の簡単な説明

図1

図1は、サッカロマイセス・セレビシエにおけるコドン用法と使用頻度を示す図である。

図2

- 25 図2は、ウシ由来のLDHの塩基配列とこれを改変設計した塩基配列とのホモロジー解析結果を示す図である。上段がウシ由来のLDH塩基配列であり、下段が改変塩基配列であり、改変塩基配列においてウシ由来の塩基配列と異なる塩基が記号(A, T, CあるいはG)で記載されている。

図3

図 3 は、実施例 1 で用いた PCR による長鎖 DNA 合成に使用したプライマー構成と、合成ステップ（ステップ 1～4）を示す図である。

図 4

図 4 は、構築されたベクター pBTrp-PDC1-LDHKCB のプラスミドマップを示す図である。

図 5

図 5 は、図 5 に示すベクターの構築工程の一部を示す図である。

図 6

pBTrp-PDC1-LDH の構築工程の一部を示す図である。

10 図 7

図 7 は、pBTrp-PDC1-LDH の構築工程の一部を示す図である。

図 8

図 5 に示すベクターの構築工程の一部（最終工程）を示す図である。

図 9

15 図 9 は、実施例において得られた形質転換体における染色体 DNA 上のターゲット部位の構造変化を示す図である。

図 10

図 10 は、実施例における乳酸生産量とエタノールを示す図である。

図 11

20 図 11 は、実施例における乳酸生産量とエタノール生産量との経緯を示す図である。

図 12

図 12 は、ウシ由来の L-乳酸脱水素酵素のピルビン酸飽和曲線を示す図である。

25 図 13

図 13 は、ウシ由来の L-乳酸脱水素酵素の Lineweaver-Burk プロットを示す図である。

図 14

図 14 は、乳酸菌 *Bifidobacterium longum* 由来の L-乳酸脱水素酵素をコード

するDNAセグメントを有するベクター（pBTrp-PDC1P-LDH；
7.11kb）の構築工程の一部を示す図である。

図15

図15は、乳酸菌*Bifidobacterium longum*由来のL-乳酸脱水素酵素をコード
5 するDNAセグメントを有するベクター（pBTrp-PDC1P-LDH；
7.11kb）の構築工程の一部を示す図であって、図14に示す工程の後段の
工程を示す図である。

図16

図16は、酵母由来のピルビン酸脱炭酸酵素のピルビン酸飽和曲線を示す図で
10 ある。

図17

図17は、酵母由来のピルビン酸脱炭酸酵素のLineweaver-Burkプロットを示
す図である。

【0009】

15 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

（形質転換体）

形質転換体において発現される外来タンパク質は、乳酸脱水素酵素（LDH）
活性を有し、かつ、形質転換しようとする宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸
20 酵素との関係において、その酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそ
れを超える対ピルビン酸基質親和性を備えている。

ここで、LDHは、酵母などの生物の解糖系において、ピルビン酸から乳酸を
生産する反応を媒介する酵素として知られている。ここで、乳酸は、L（+）-
乳酸とD（-）-乳酸とを含むが、好ましくは、L（+）-乳酸であるL（+）
25 -乳酸は、L（+）-LDHによって生産され、D（-）-乳酸は、D（-）-
LDHによって生産される。

【0010】

本発明で用いる外来タンパク質としてLDHを用いることができる。生物の種
類に応じてあるいは生体内においても各種同族体が存在する。本発明におけるL

DH活性を備えるタンパク質としては、天然由来のLDHの他、化学合成的あるいは遺伝子工学的に人工的に合成されたLDHも包含している。

LDHとしては、好ましくは、酵母などの真核微生物由来であり、より好ましくは、植物、動物、昆虫などの高等真核生物由来であり、さらに好ましくは、ウシを始めとする哺乳類を含む高等真核生物由来である。最も好ましくは、ウシ由来のLDHである。例えば、ウシ由来のLDHとして配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質を挙げることができる。

ウシ由来LDHとしては、筋肉由来、心臓由来などのLDHがあり、いずれも使用することができる。なお、酵素番号としては、EC 1. 1. 1. 27を挙げることができる。

【0011】

さらに、本発明における外来タンパク質は、これらのLDHのホモログも包含している。LDHホモログは、天然由来のLDHのアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列でありかつLDH活性を有しているタンパク質、および、天然由来のLDHとアミノ酸配列の相同性が少なくとも70%、好ましくは80%以上を有しかつLDH活性を有しているタンパク質を含んでいる。

なお、アミノ酸配列における変異の数は、もとのタンパク質の機能が維持できる限り制限されないが、全アミノ酸の70%以内であることが好ましく、より好ましくは、30%以内であり、さらに好ましくは20%以内である。

例えば、配列番号1に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を有し、かつLDH活性を有しているタンパク質、あるいは、配列番号1に示すアミノ酸配列との相同性が少なくとも70%、好ましくは80%を有し、かつLDH活性を有するタンパク質は、好ましいホモログである。

なお、配列の相同性は、BLAST(<http://blast.genome.ad.jp/>)、FASTA(<http://fasta.genome.ad.jp/SIT/FASTA.html>)などによる相同性検索を利用して決定することができる。

【0012】

なお、アミノ酸配列における改変は、改変しようとするアミノ酸配列に、部位特異的変位導入法（Current Protocols I Molecular Biology edit. Ausubel et al., (1987) Publish . John Wily & Sons Sectoin 8.1-8.5）等を用いて、適宜、置換、欠失、挿入、および／または付加変異を導入することにより行うことができる。また、このよ
 5 うな改変は、人工的に変異を導入しあるいは合成したものに限られず、人工的な変異処理に基づいてあるいはこれに限られず自然界におけるアミノ酸の変異によっても生じたものも包含される。

【 0 0 1 3 】

また、本発明で用いる外来タンパク質は、ピルビン酸に対して高い基質親和性を有していることが好ましい。ここで基質親和性とは、式（１）に示すミカエリス－メンテン（Michaelis-Menten）の式におけるKm値である。

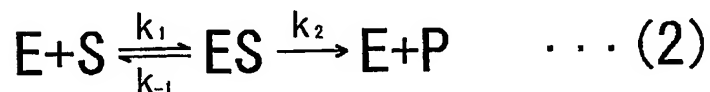
数式 1

$$v_0 = k_2 E_0 [S] / ([S] + K_m) \dots\dots\dots (1)$$

ただし、 v_0 は定常初速度、 $[S]$ は基質濃度、 $[ES]$ は酵素と基質との複合体の濃度、 E_0 は酵素の全濃度、 k_2 は $ES \rightarrow E + S$ の場合の速度定数である。

ミカエリス－メンテンの式は、以下の式（２）に示す基質S、酵素E、基質－酵素複合体ES、および生成物Pとの関係に基づいている。 k_1 は、基質Sと酵素Eが複合体ESを形成するときの平衡定数であり、 k_2 は、複合体ESから生成物Pと酵素Eとが生成する平衡定数であり、 k_{-1} は、複合体ESが酵素Eと
 20 基質Sとに解離するときの平衡定数である。

数式 2



【 0 0 1 4 】

ここで、定数からKmは以下の式（３）で定義することができる。

25 数 3

$$v_0 = k_2 [ES]$$

$$k_1 [E][S] = (k_2 + k_{-1}) [ES]$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} = K_m \quad \dots (3)$$

さらに、式（４）に示すように、各種濃度で書き換えることができる。

数 4

$$K_m = (E_0 - [ES]) [S] / [ES] \quad (4)$$

【 0 0 1 5 】

基質親和性は、例えば、酵素濃度一定下で、基質濃度[S]と初速度 v_0 との関係を求め、基質濃度を横軸に初速度を縦軸にとったグラフなどから求めることができる。また、Lineweaver-Burkプロットによっても求めることができる。

10 【 0 0 1 6 】

本発明の外来タンパク質の対ピルビン酸基質親和性は、宿主生物のピルビン酸脱炭酸酵素との関係において、この酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かあるいはそれを超えていることが好ましい。基質親和性の比較は、好ましくは、温度およびpHなどの条件を共通とする。温度やpH条件は、宿主生物におけるこれらの酵素の触媒する環境を考慮して決定することができる。例えば、温度30～37℃、pHを6.0～7.5の条件下で両酵素の基質親和性を測定することが好ましい。

【 0 0 1 7 】

20 本外来タンパク質の対ピルビン酸基質親和性は、好ましくは、約1.5mM以下である。1.5mMを超えると、宿主生物のもつピルビン酸脱炭酸酵素とピルビン酸とが反応しやすくなるからである。より好ましくは1mM以下である。さ

らに好ましくは、0.5 mM以下であり、もっとも好ましくは、0.1 mM以下である。

また、本外来タンパク質の対ピルビン酸基質親和性は、宿主生物のピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等かそれよりも高いことが好ましい。

- 5 宿主生物の当該酵素のピルビン酸基質親和性よりも低ければ、宿主生物のピルビン酸脱炭酸酵素とピルビン酸とが反応しやすくなるからである。なお、本明細書において基質親和性が同等とは、対比する双方の基質親和性、すなわち、 K_m 値が同等であることを意味し、基質親和性が高いとは、その基質親和性（ K_m 値）が対比すべき他方の K_m 値よりも低いことを意味する。

10 【0018】

本形質転換体においては、このような外来タンパク質をコードするDNAが導入されている。本DNAは、cDNA、ゲノムDNA、合成DNAなど、その由来を問うものではない。

- 15 また、本DNAは、LDHをコードする天然由来の塩基配列を有していてもよいし、かかる塩基配列の一部あるいは全体が改変された塩基配列であって、LDH活性を有するタンパク質をコードするものであってもよい。また、LDHホモログをコードする合成あるいは天然由来の塩基配列を有するDNAであってもよい。

【0019】

- 20 本発明で使用するDNAは、形質転換しようとする宿主生物において多用されるコドン用法を用いた塩基配列を有することができる。例えば、本DNAは、サッカロマイセス属、とくに、サッカロマイセス・セレビスエにおけるコドン用法を用いて遺伝暗号化された塩基配列を有することができる。

【0020】

- 25 なお、DNAは、化学的に合成することもできるし、長鎖DNAの合成方法として知られている藤本らの手法（藤本英也、合成遺伝子の作製法、植物細胞工学シリーズ7 植物のPCR実験プロトコル、1997、秀潤社、p95-100）を採用することもできる。

【0021】

(DNA構築物)

本外来タンパク質のアミノ酸配列をコードするDNAを宿主細胞に導入してこのDNAがコードするタンパク質を発現させることにより、宿主細胞において乳酸を生産させることができる。

- 5 形質転換にあたっては、本DNAからなるDNAセグメントを、宿主細胞内で発現可能とするDNA構築物を用いる。形質転換のためのDNA構築物の態様としては、特に限定しないでプラスミド(DNA)、バクテリオファージ(DNA)、レトロトランスポゾン(DNA)、人工染色体(YAC、PAC、BAC、MAC等)を、外来遺伝子の導入形態(染色体外あるいは染色体内)や宿主細胞の種類に
10 応じて選択して採用することができる。また、線状あるいは環状の形態を問うものではない。したがって、本DNA構築物は、本DNAの他、これらのいずれかの態様のベクターの構成セグメントを備えることができる。好ましい原核細胞性ベクター、真核細胞性ベクター、動物細胞性ベクター、植物細胞性ベクターは当該分野において周知である。

15 【0022】

- なお、プラスミドDNAとしては、例えば、pRS413、pRS415、pRS416、YCp50、pAUR112またはpAUR123などのYCp型大腸菌-酵母シャトルベクター、pYES32またはYEpl3などのYEpl型大腸菌-酵母シャトルベクター、pRS403、pRS404、pRS405、
20 pRS406、pAUR101またはpAUR135などのYIpl型大腸菌-酵母シャトルベクター、大腸菌由来のプラスミド(pBR322、pBR325、pUC18、pUC19、pUC119、pTV118N、pTV119N、pBluescript、pHSG298、pHSG396又はpTrc99AなどのColE系プラスミド、pACYC177又はpACYC184などのp1
25 A系プラスミド、pMW118、pMW119、pMW218又はpMW219などのpSC101系プラスミド等)、枯草菌由来のプラスミド(例えば、pUB110、pTP5等)などを挙げるができる。ファージDNAとしては、λファージ(Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt100、gt11、zap)、φX174、M13mp18又はM13m

p 1 9などを挙げる事ができる。レトロトランスポゾンとしては、Ty因子などを挙げる事ができる。YACとしては、pYACC2などを挙げる事ができる。

【0023】

- 5 本DNA構築物を作製するには、本DNAを含むフラグメントなどを適当な制限酵素で切断し、使用するベクターDNAの制限酵素部位あるいはマルチクローニングサイトに挿入などすることによる。

本DNA構築物の第1の態様は、本DNAからなるDNAセグメントを発現可能に連結されるプロモーターセグメントを備えている。すなわち、プロモーター
10 により制御可能にそのプロモーターの下流側に本DNAセグメントが連結されている。

【0024】

- 本DNA産物、すなわち、LDH活性を備えるタンパク質の発現にあつては、酵母における発現が好ましいことから、酵母中で発現するプロモーターを使用
15 することが好ましい。かかるプロモーターとしては、例えば、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子プロモーター、gal1プロモーター、gal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1プロモーター、PH05プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター、AOX1プロモーターなどを使用することが好ましい。特に、サッカロマイセス属由来
20 のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子プロモーターが好ましく、サッカロマイセス・セレビシエ由来のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子プロモーターを利用することがより好ましい。これらのプロモーターは、サッカロマイセス属（セレビシエ）のエタノール発酵経路において高発現されているからである。なお、かかるプロモーター配列は、サッカロマイセス属酵母のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のゲノムDNAを鋳型とするPCR増幅法によって単離することができる。サッカロマイセス・セレビシエ由来の当該プロモーターの塩基配列を、配列番号2に示す。
25 本DNA構築物におけるプロモーターセグメントには、この配列番号2記載の塩基配列からなるDNAの他、この塩基配列において1若しくは数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつプロモーター活性を有

するDNA、配列番号2で示される塩基配列の全部若しくは一部の配列から調製されたDNAあるいはその相補鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有するDNA（換言すれば、当該プロモーターのホモログ）を用いることができる。

5 【0025】

また、本DNA構築物の他の態様である第2のDNA構築物は、本DNAの他、宿主染色体を相同組換えのためのDNAセグメントを備える。相同組換え用DNAセグメントは、宿主染色体において本DNAを導入しようとするターゲット部位近傍のDNA配列と相同なDNA配列である。相同組換え用DNAセグメントは、少なくとも1個備えられ、好ましくは、2個備えられている。例えば、2個の相同組換え用DNAセグメントを、染色体上のターゲット部位の上流側と下流側のDNAに相同なDNA配列とし、これらのDNAセグメントの間に本DNAを連結することが好ましい。

 【0026】

15 相同組換えにより宿主染色体に本DNAを導入する場合、宿主染色体上のプロモーターにより制御可能な状態で本DNAを導入することができる。この場合、本DNAの導入によって、同時に、本来当該プロモーターによって制御されるべき内在性遺伝子を破壊し、この内在性遺伝子に替えて外来の本DNAを発現させることができる。特に、当該プロモーターが、宿主細胞において高発現プロモーターである場合に有用である。

 【0027】

かかる発現系を宿主染色体上に創出するには、宿主染色体において高発現遺伝子をターゲットとし、この遺伝子を制御するプロモーターの下流にプロモーターにより制御を受けるように本DNAを導入するようにすることが好ましい。酵母などのエタノール発酵性微生物を宿主とする場合、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子（特に、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子）をターゲットとし、内在性のピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子プロモーターの制御下にLDH活性タンパク質をコードするDNAを導入することができる。この場合、相同組換え用DNAセグメントは、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のLDHの構造遺伝子領域あるいはその近傍の配

列（開始コドンの近傍の配列、開始コドンの上流域の配列、構造遺伝子内の配列などを含む）と相同とすることができる。好ましくは、サッカロマイセス属（特にセレビスエ）を宿主として、この宿主のピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子をターゲットとする DNA 構築物とする。かかる DNA 構築物によれば、ピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子の破壊とこの構造遺伝子部分の LDH による置換を一つのベクターで達成することができる。ピルビン酸脱炭酸酵素 1 は、ピルビン酸からアセトアルデヒドへの付加逆反応を媒介する酵素であり、この遺伝子を破壊することにより、アセトアルデヒドを経たエタノール生産が抑制されることが期待されるとともに、ピルビン酸を基質とする LDH による乳酸生産が促進されることが期待できる。

【0028】

なお、第 1 の DNA 構築物であっても、宿主染色体との相同組換えのための DNA セグメントを備えることにより、相同組換え用の DNA 構築物とすることができる。第 1 の DNA 構築物にあっては、DNA 構築物中のプロモーターセグメントを、宿主染色体との相同組換え用の DNA セグメントに兼用することもできる。例えば、宿主サッカロマイセス・セレビスエに対して、サッカロマイセス・セレビスエ宿主染色体にあるプロモーター、例えば、ピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子プロモーターをプロモーターセグメントとして有する DNA 構築物は、当該遺伝子 1 をターゲット部位とするターゲティングベクターを構成する。この場合、ピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子の構造遺伝子領域に対する相同配列を備えることが好ましい。

【0029】

なお、DNA 構築物には、ターミネーター他、必要に応じてエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD 配列）を連結することができる。選択マーカーとしては、特に限定しないで、薬剤抵抗性遺伝子、栄養要求性遺伝子などを始めとする公知の各種選択マーカー遺伝子を利用できる。例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等を使用することができる。

【 0 0 3 0 】

(DNA構築物による形質転換)

一旦、DNA構築物が構築されたら、適当な宿主細胞に、トランスフォーメーション法や、トランスフェクション法、接合法、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション法、リポフェクション法、酢酸リチウム法、パーティクルガン法、リン酸カルシウム沈殿法、アグロバクテリウム法、PEG法、直接マイクロインジェクション法等の各種の適切な手段のいずれかにより、これを導入することができる。DNA構築物の導入後、その受容細胞は、選択培地で培養される。

【 0 0 3 1 】

10 宿主細胞は、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*などの細菌、サッカロマイセス・セレビシエ、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などの酵母、s f 9、s f 2 1等の昆虫細胞、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) などの動物細胞、サツマイモ、タバコなどの植物細胞などとすることができる。好ましくは、酵母などの
15 アルコール発酵を行う微生物あるいは耐酸性微生物であり、例えば、サッカロマイセス・セレビシエなどのサッカロマイセス属を始めとする酵母である。具体的には、サッカロマイセス・セレビシエ I F O 2 2 6 0 株や同 Y P H 株である。

【 0 0 3 2 】

DNA構築物によって形質転換された形質転換体においては、DNA構築物の
20 構成成分が染色体上あるいは染色体外因子 (人工染色体を含む) 上に存在することになる。なお、DNA構築物が染色体外に維持されている場合、あるいは、ランダムインテグレーションにより染色体に組み込まれている場合には、LDHの基質であるピルビン酸を基質とする他の酵素、例えば、ピルビン酸脱炭酸酵素の遺伝子 (サッカロマイセス属酵母においては、ピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子)
25 は、ターゲティングベクターによりノックアウトされていることが好ましい。

上述のDNA構築物であって、相同組換えを達成できるDNA構築物が導入されると、宿主染色体上の所望のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログの下流に当該プロモーターによって制御可能に連結された本DNAであるDNAセグメントが存在することになる。サッカロマ

イセス属酵母の形質転換体にあつては、宿主染色体上において、ピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子プロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログの下流に当該プロモーターによって制御可能に本 DNA を備えることが好ましい。

- 5 また、通常、相同組換え体における本 DNA の下流側には、選択マーカー遺伝子や、破壊された構造遺伝子の一部（DNA 構築物上の相同配列に対応する部位）が存在する。

【 0 0 3 3 】

- 10 なお、所望のプロモーター下に本 DNA が導入されたか否かの確認は、PCR 法やサザンハイブリダイゼーション法により行うことができる。例えば、形質転換体から DNA を調製し、導入部位特異的プライマーにより PCR を行い、PCR 産物について、電気泳動において予期されるバンドを検出することによって確認できる。あるいは蛍光色素などで標識したプライマーで PCR を行うことでも確認できる。これらの方法は、当業者において周知である。

- 15 【 0 0 3 4 】

（乳酸の製造）

- 20 DNA 構築物が導入されて得られる形質転換体を培養することにより、培養物中に外来遺伝子の発現産物である乳酸が生成する。培養物から乳酸を分離する工程を実施することにより、乳酸を得ることができる。なお、本発明において培養物とは、培養上清の他、培養細胞あるいは菌体、細胞若しくは菌体の破碎物を包含している。

本発明の形質転換体の培養にあたっては、形質転換体の種類に応じて培養条件を選択することができる。このような培養条件は、当業者においては周知である。

- 25 大腸菌や酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化可能な炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれも使用することができる。炭素源としては、グルコース、フルクトース、スクロース、デンプン、セルロース等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコールを用いることができる。窒素源としては、

- アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩またはその他の含窒素化合物の他、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等を用いることができる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウムなどを用いることができる。

【0035】

- 培養は、通常、振とう培養または通気攪拌培養等の好気条件下、30℃で6～24時間行う。培養期間中、pHは2.0～6.0に保持することが好ましい。
- 10 また、pHの調整は、無機あるいは有機酸、アルカリ溶液等を用いて行うことができる。培養中は、必要に応じてアンピシリン、テトラサイクリンなどの抗生物質を培地に添加することができる。

【0036】

- 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地、DMEM培地またはこれらの培地にウシ胎児血清などを添加した培地を用いることができる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1～30日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

【0037】

- 20 培養は、回分式であっても連続式であってもよい。培養方式としては、アンモニアやカルシウム塩などのアルカリにより中和しつつ乳酸アンモニウムや乳酸カルシウムなどの乳酸塩として得る方式のほか、フリーの乳酸として得る方式も採用できる。

- 25 培養終了後、培養物から遺伝子産物である乳酸を分離するには、通常の精製手段などを各種組み合わせて使用することができる。例えば、形質転換細胞内に生産された場合は、常法により菌体を超音波破壊処理、摩砕処理、加圧破碎などに細胞を破壊して、遺伝子産物を細胞と分離することができる。この場合、必要に応じてプロテアーゼを添加する。また、培養上清に乳酸が生産された場合には、この溶液を、ろ過、遠心分離などにより固形分を除去する。

【 0 0 3 8 】

例えば、培養工程終了後は、培養液をベルトプレス、遠心分離、フィルタープレスなどの少なくとも1種の固液分離処理によって固液分離工程を実施することができる。分離したろ液については、精製工程を実施することが好ましい。精製工程においては、例えば、乳酸を含むろ液を電気透析によって乳酸以外の有機酸や糖類を除去して乳酸あるいは乳酸アンモニウム水溶液とすることができる。乳酸アンモニウム液の場合、バイポーラ膜等によってアンモニアを分解し、乳酸水溶液とアンモニア水とすることができる。該ろ液中の乳酸以外の有機酸や糖類の含量が比較的少ない場合には、電気透析をせず、必要に応じて水分を蒸発させて濃縮し、バイポーラ膜の処理を行うこともできる。

なお、培養液、粗抽出画分に対しては、上記方法に限られず、有機溶剤による分離抽出、蒸留等の各種精製分離法等を利用して、乳酸あるいはその塩を精製することができる。また、必要に応じて、培養液、粗抽出画分及びその精製物に対してエステル化、ラクチド化、オリゴマーあるいはプレポリマー化等の処理を行うことにより、各種の乳酸誘導体を得ることができる。必要に応じて、乳酸発酵液から乳酸、その塩及びその誘導体の1種あるいは2種以上を採取することができる。

【 0 0 3 9 】

(実施例)

以下に、本発明の具体例を記載するが、本発明は以下の具体例に限定する趣旨ではない。

【 0 0 4 0 】

(実施例1：L-乳酸脱水素酵素遺伝子のDNA配列の設計)

高等真核生物であるウシ由来のタンパク質であるL-乳酸脱水素酵素を、酵母サッカロマイセス・セレビシエ属において効率的に生産するために、ウシ由来L-乳酸脱水素酵素のアミノ酸配列をコードするDNAに対して、以下の項目を設計指針として、天然にない新規な遺伝子配列を設計した。

- 1) サッカロマイセス・セレビシエにおいて多用されているコドンを用いた。
- 2) 開始コドンをはさんでコザック配列(ANNA TGG)を付加した。

3) mRNAの不安定配列や繰り返し配列をできる限り排除した
4) 全領域にわたってGC含量の偏りに差がでないようにした。
5) 設計した配列中に遺伝子クローニングに不適当な制限酵素部位ができないようにした。

- 5 6) 染色体導入型ベクターに組み込むための両末端に有用な制限酵素EcoRI、XhoI、AflIII部位を付加した。

酵母におけるコドンの使用頻度は、コドンユーセージデータベース (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) から得られるサッカロマイセス・セレビシエのコドンユーセージを図2に示す。この図において特定アミノ酸に対応して多用されているコドン₁₀を特定した(下線をしたコドン)。

【0041】

図1に示すコドンユーセージにおける多用コドンの適用の他、上記2)～5)の設計指針に基づいて得られたLDH活性を有するタンパク質をコードする新規なDNA配列(999bp)(以下、LDHKCB遺伝子と称す。)を配列番号3
15 に示す。また、配列番号3に示すDNA配列とその開始コドンの上流側および終止コドンの下流側とを含むDNA配列(1052bp)(以下、LDHKCB配列と称す。)を配列番号4に示す。

【0042】

配列番号3に記載のDNA配列においては、メチオニン以外の全てのアミノ酸
20 において、もとのDNA配列で使ったのと異なるコドンを使用していた。なお、新たに採用されたコドンは、全て図1に示す多用コドンであった。さらに、もとのウシ由来のLDH遺伝子とLDHKCB遺伝子とについて、コンピューターによるホモロジー解析を行った結果を図2に示す。図2から明らかなように、DNA配列のほぼ全域にわたって多数の置換を要することがわかった。

25 【0043】

(実施例2：LDHKCB配列の全合成)

本実施例では、長鎖DNAの合成方法として知られている藤本らの手法(藤本英也、合成遺伝子の作製法、植物細胞工学シリーズ7 植物のPCR実験プロトコール、1997、秀潤社、p95-100)を用いた。この方法の原理は、1

00mer程度のオリゴヌクレオチドプライマーを3'末端に10~12mer程度のオーバーラップを持つように作製し、お互いのオリゴヌクレオチドプライマーのオーバーラップ領域を利用して、欠損部分を伸長させ、さらに両末端のプライマーを用いてPCRを行うことによって増幅するというものである。この操作を順次繰り返し、目的とする長鎖DNAを合成する。PCR増幅装置には、Gene Amp PCR system 9700 (PE, Applied Biosystems)を使用した。

具体的には、最初に連結させたい2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを混合し、KOD-plus-DNA polymerase (東洋紡) 存在下で、96℃、2分、68℃2分、54℃2分、72℃30分の反応条件でDNA伸長反応を行った。次に、本試料の1/10量を鋳型にして、両末端のプライマー存在下で、96℃2分後、96℃で30秒、55℃で30秒、72℃で90秒を1サイクルとし、これを25サイクル行い、その後4℃とするPCR反応をおこなった。反応におけるバッファ、dNTPmixなどは、DNA polymeraseに附属のものを使用した。

一連のオーバーラップPCR法を図3に従って順次行っていき、最終目的とする遺伝子断片を作製した。図3に示す各種プライマー (BA、B01、BB、B02、BC、B03、BD、B04、BE、B05、BF、B06、BG、B07、BH、B08、BI、B09、BJ、B10、BK、B11、BL、B12、BM、B13、BN、B14) の全28種のプライマーのDNA配列を配列番号5~32にそれぞれ示す。合成したLDHKCB配列について、塩基配列を確認した後、EcoRIにて制限酵素処理し、同様にEcoRIにて酵素処理したpCR2.1 TOPO Vector (Invitrogen) に常法により連結した。このベクターをpBTOPO-LDHKCBベクターと称した。

【0044】

25 (実施例3：酵母染色体導入用ベクターの構築)

実施例2において全合成したLDHKCB配列を用いて、酵母染色体導入型ベクターを構築した。このベクターを、pBTRP-PDC1-LDHKCBと称し、このプラスミドマップを図4に示す。

1. pBTrp-PDC1-LDHKCB構築のためのPDC1P断片の単離

PDC1P断片は、サッカロマイセス・セレビシエYPH株 (Stratagene社) のゲノムDNAを鋳型として使用したPCR増幅法によって単離を行った。

【0045】

5 サッカロマイセス・セレビシエYPH株のゲノムDNAは、ゲノム調製キットであるFast DNA Kit (Bio 101社) を用い、詳細は、附属のプロトコールに従い、調製した。DNA濃度は分光光度計Ultraspec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech社) にて測定した。

【0046】

10 PCR反応には、増幅酵素として、増幅断片の正確性が高いとされるPyrobest DNA Polymerase (宝酒造) を使用した。上記手法にて調製したサッカロマイセス・セレビシエYPH株のゲノムDNA 50 ng/サンプル、プライマーDNA 50 pmol/サンプル、及びPyrobest DNA polymerase 0.2 ユニット/サンプルを合計で50 μ lの反応系に調製した。反応溶液を、PCR増幅装置 Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystem社) によってDNA増幅を行った。PCR増幅装置の
15 反応条件は、96℃2分の後、96℃で30秒、55℃で30秒、72℃で90秒を1サイクルとし、これを25サイクル行い、その後4℃とした。PCR増幅断片を1%TBEアガロースゲル電気泳動にて遺伝子増幅断片の確認を行った。なお反応に使用したプライマーDNAは、合成DNA (サワデーテクノロジー社)
20 を用い、このプライマーのDNA配列は以下の通りであった。

【0047】

・PDC1P-LDH-U (31mer, Tm値58.3℃) 末端に制限酵素BamHIサイトを付加
: ATA TAT GGA TCC GCG TTT ATT TAC CTA TCT
25 C (配列番号33)
・PDC1P-LDH-D (31mer, Tm値54.4℃) 末端に制限酵素EcoRIサイトを付加
: ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT GAC TGT
G (配列番号34)

【0048】

2. プロモーター及び目的遺伝子を含む組換えベクターの構築

サッカロマイセス・セレビスエ由来のビルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子(PDC1)プロモーター配列の制御下で、目的遺伝子としてウシ由来のL-乳酸脱水素酵素遺伝子(LDH遺伝子)を使用した。

【0049】

本組換えベクター構築のために新たに構築した染色体導入型ベクターをpBTrp-PDC1-LDHKCBと名付けた。以下に本ベクター構築例の詳細を記す。なお本実施例の概要を図5～8に示す。但し、ベクター構築の手順はこれに限定されるものではない。

ベクターの構築にあたって、必要な遺伝子断片であるPDC1遺伝子のプロモーター断片(PDC1P)971bpと、PDC1遺伝子下流領域断片(PDC1D)518bpは、上述のように、サッカロマイセス・セレビスエYPH株のゲノムDNAを鋳型として使用したPCR増幅法によって単離を行った。PCR増幅の手順は上記の通りであるが、PDC1遺伝子下流領域断片の増幅には、以下のプライマーを使用した。

・PDC1D-LDH-U(34mer、T_m値55.3℃)末端に制限酵素XhoIサイトを付加

:ATA TAT CTC GAG GCC AGC TAA CTT CTT GGT
CGA C (配列番号35)

・PDC1D-LDH-D(31mer、T_m値54.4℃)末端に制限酵素ApaIサイトを付加

:ATA TAT GAA TTC TTT GAT TGA TTT GAC TGT
G (配列番号36)

【0050】

上記反応にて取得したPDC1P及びPDC1D各遺伝子増幅断片をそれぞれ、エタノール沈殿処理によって精製した後、PDC1P増幅断片を制限酵素BamHI/EcoRI及びPDC1D増幅断片を制限酵素XhoI/ApaIにて制限酵素反応処理を行った。なお、以下に用いた酵素類はすべて宝酒造社製のもの

を用いた。また、エタノール沈殿処理、制限酵素処理の一連操作の詳細なマニュアルはMolecular Cloning A Laboratory Manual second edition (Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory press. 1989)に従った。

【0051】

ベクターの構築における一連の反応操作は、一般的なDNAサブクローニング法に準じて行った。すなわち、制限酵素BamHI/EcoRI（宝酒造社）及び脱リン酸化酵素Alkaline Phosphatase（BAP、宝酒造社）を施したpBluescript II SK+ベクター（東洋紡社）に、上記PCR法にて増幅し制限酵素処理を施したPDC1P断片をT4 DNA Ligase反応によって連結させた（図5上段）。T4 DNA Ligase反応には、LigaFast Rapid DNA Ligation System（プロメガ社）を用い、詳細は付属のプロトコールに従った。

【0052】

次にLigation反応を行った溶液を用いて、コンピテント細胞への形質転換を行った。コンピテント細胞は大腸菌JM109株（東洋紡社）を用い、詳細は付属のプロトコールに従って行った。得られた培養液は抗生物質アンピシリン100 μ g/mlを含有したLBプレートにまいて一晚培養した。生育したコロニーにつき、インサート断片のプライマーDNAを用いたコロニーPCR法による確認、及びミニプレップによるプラスミドDNA調製溶液に対する制限酵素処理による確認を行い、目的とするベクターpBPDC1Pベクターを単離した（図5中段）。

【0053】

ついで、図5の中段に示すように、株式会社豊田中央研究所によって構築されたpBTOPO-LDHKCBベクターを制限酵素EcoRI処理及び末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理することで得られるLDHKCB遺伝子断片を、同じく制限酵素EcoRI処理、末端修飾酵素T4 DNA polymerase処理を行ったpBPDC1Pベクター中に、上述と同様の操作で

サブクローニングを行い、pBPDC1P-LDHKCBベクターを作製した(図5下段)。

【0054】

一方、図6に示すように、トヨタ自動車(株)によって構築されたpYLD1
5 ベクターを制限酵素EcoRI/AatII処理及び末端修飾酵素T4 DNA
polymerase処理することで得られるLDH遺伝子(ビフィドバクテリ
ウム・ロンガム由来)断片を、同じく制限酵素EcoRI処理、末端修飾酵素T
4 DNA polymerase処理を行ったpBPDC1Pベクター中に、上
述と同様の操作でサブクローニングを行い、pBPDC1P-LDH1ベクター
10 を作製した(図6)。なお、上記のpYLD1ベクターは大腸菌に導入され(名
称:「E.coli pYLD1」)、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物
寄託センター(〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)
に、受託番号FERM BP-7423としてブダペスト条約に基づき国際寄託
されている(原寄託日:平成11(1999)年10月26日)。

15 【0055】

続いて、図7に示すように、このベクターをXhoI/ApaI処理し、同様
に制限酵素処理を施した増幅PDC1D断片を連結させてpBPDC1P-LD
Hベクターを作製した(図7上段)。最後にpBPDC1P-LDHI1ベクタ
ーをEcoRV処理したものに、pRS404ベクター(Stratagene
20 社)をAatII/SspI処理、T4 DNA polymerase処理して
得られたTrpマーカ断片を連結させて、pBTrp-PDC1-LDHベク
ターを構築した。

【0056】

次に、図8に示すように、pBPDC1P-LDHKCBベクターをApaI
25 /EcoRIにて制限酵素処理し、一方、pBTrp-PDC1-LDHベクタ
ーを、制限酵素ApaIおよびStuIで処理したTrpマーカを含む断片に
処理し、増幅させた断片を連結させて、最終コンストラクトである染色体導入型
pBTrp-PDC1-LDHKCBベクターを構築した。

【0057】

構築した染色体導入型 pBTrp-PDC1-LDHKCB ベクターの確認の
為に塩基配列決定を行った。塩基配列解析装置として ABI PRISM 310
Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems 社) を使用し、試料の調製法、及び機器の使用方法等の詳細は本装置付属のマ
ニュアルに従った。試料となるベクターDNAはアルカリ抽出法により調製した
5 ものを、これを GFX DNA Purification kit (Amershan Pharmacia Biotech 社) にてカラム精製した後、分
光光度計 Ultrospec 3000 (Amershan Pharmacia Biotech 社) にて DNA 濃度を測定したものを用いた。

【0058】

(実施例 4 : 酵母の形質転換)

酵母への遺伝子導入法は、Ito らの手法 (Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata and
A. Kimura, Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations
J. Bacteriol. Vol. 153, p163-168) に従った。すなわち、宿主である酵母 I F
15 O2260 株 (社団法人発酵研究所に登録されている菌株) のトリプトファン合
成能を欠損した株を、10ml YPD 培地にて 30℃ で対数増殖期まで培養を行
い、集菌および TE バッファによる洗浄を行った。次に、0.5ml TE バッ
ファと 0.5ml 0.2M の酢酸リチウムを加え、30℃ にて 1 時間の振とう
培養を行った後に、実施例 3 の手法を用いて構築した染色体導入型ベクター pB
20 Trp-PDC1-LDHKCB ベクターを、制限酵素 ApaI および SacI
(いずれも宝酒造) で処理して、これを添加した。

【0059】

本酵母懸濁液を 30℃ で 30 分振とう培養後、150 μ l の 70% ポリエチレ
ングリコール 4000 (和光純薬) を加え、よく攪拌した。さらに、30℃ にて
25 1 時間振とう培養した後、42℃ にて 5 分間ヒートショックを与え、菌体を洗浄
した後、200 μ l の水に懸濁したものをトリプトファン選択培地に塗抹した。

【0060】

得られたコロニーを新たなトリプトファン選択培地に画線培養し、安定性が確
認できた選抜株について、遺伝子導入の有無を PCR 解析によって確認した。P

CRに鋳型として用いる酵母のゲノムDNAは、シングルコロニーを2ml YPD培地で一晚振とう培養を行った後、集菌し、50mM Tris-HCl 500 μ l およびガラスビーズ(425~600 μ m、Acid washed、SIGMA)を加え、4℃で15分間ボルテックスを行うことにより調製した。本溶液の上清を用いてエタノール沈殿を行い、滅菌水50 μ l に溶解した、調製したゲノムDNA 5 μ l を鋳型として、50 μ l の反応系でPCRを行った。DNA増幅酵素としては、EX Taq DNA Polymerase (宝酒造)を用い、PCR増幅装置Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems)を使用した。PCR増幅装置の反応条件は、96℃2分の後、96℃で30秒、55℃で30秒、72℃で90秒を1サイクルとし、これを30サイクル行い、その後4℃とした。使用したプライマーの配列は以下の通りであった。

LDH-KCB-U: TGG TTG ATG TTA TGG AAG AT (20mer) (配列番号37)

LDH-KCB-D: GAC AAG GTA CAT AAA ACC CAG (21mer) (配列番号38)

PDC1P-U3: GTA ATA AAC ACA CCC CGC G (19mer) (配列番号39)

【0061】

安定したトリプトファン合成能を有し、かつ、これらのプライマーのもとでPCR増幅が確認できたものを、LDHKCB遺伝子が適切に導入された形質転換株であると判断した。本実施例においては、かかる形質転換株として、KCB-27株、KCB-210株、およびKCB-211株の3種の菌株を取得することができた。これら酵母サッカロマイセス・セレビシエ形質転換体のゲノム染色体上の構造を図9に示す。

【0062】

(実施例5: 形質転換体におけるL-乳酸生産量の測定)

作製した3種の形質転換株について発酵試験を行った。前培養として、グルコース濃度2%のYPD液体培地で一晚培養を行い、これを集菌および洗浄後、グ

ルコース濃度 15 % の Y P D 液体培地に菌体濃度が 1 % (0 . 5 g / 5 0 m l) になるように植菌し、30 °C の静置培養にて数日間発酵を行った。本発酵液を 24 時間ごとに採取し、溶液中に含まれる L - 乳酸量を想定した。生産量の測定は、バイオセンサ B F - 4 (王子計測機器) を用い、測定方法の詳細は、附属の取り扱い説明書に従った。

【 0 0 6 3 】

グルコース濃度 15 % で発酵 3 日目における培養液中の L - 乳酸量およびエタノール量を測定した結果を図 10 および表 1 に示す。また、K C B - 27 株については、0 ~ 5 日目の L - 乳酸量とエタノール量との経緯を図 11 と表 2 に示す。

10 【表 1】

| 株の種類 | 生産量 (%) | |
|---------|---------|-------|
| | 乳酸 | エタノール |
| IF02260 | 0 | 7.34 |
| KCB-27 | 4.92 | 5.01 |
| KCB-210 | 4.78 | 5.14 |
| KCB-211 | 4.57 | 5.26 |

【表 2】

| 株の種類 | 産生量 (%) | 経過日数 | | | |
|---------|---------|------|------|------|------|
| | | 0 | 1 | 3 | 5 |
| IF02260 | グルコース | 15 | 1.84 | 0 | 0 |
| | 乳酸 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | エタノール | 0 | 6.69 | 7.21 | 7.38 |
| KCB-27 | グルコース | 15 | 2.2 | 0 | 0 |
| | 乳酸 | 0 | 3.01 | 4.73 | 4.92 |
| | エタノール | 0 | 4.69 | 5.11 | 5.06 |

15

L D H K C B 遺伝子が導入された形質転換体 (K C B - 27 株、K C B - 210 株、K C B - 211 株) では、それぞれ L D H K C B 遺伝子が 1 コピーしか導入されていないにもかかわらず、培養液 1 L あたり、4.5 ~ 5.0 % (45.0 ~ 50.0 g) の L - 乳酸生産が認められた。一方、エタノール生産量は 5 % となり、親株よりも 2.5 % 程度減少していた。

20

本結果は、過去に報告されているサッカロマイセス・セレビスエにおけるL-乳酸生産と比較して飛躍的な生産量の増大であることは明らかであった。また、かかる生産量の増大は、酵母由来のピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性よりも、同等かあるいは高い基質親和性を有するLDHを導入したことによるものと考えられる。また、染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のプロモーターの制御下に導入したことによるものと考えられる。

以上の結果から、1コピーによってもかかる生産量の増大を得られることから、2コピー以上が導入された場合には、さらなる生産量の増大を確保できることが推測される。

10 【0064】

(実施例6：各種真核生物由来のL-乳酸脱水素酵素の対ピルビン酸基質親和性(ミカエリス定数、Km値)の測定

ウシ由来のL-乳酸脱水素酵素の対ピルビン酸基質親和性(ミカエリス定数、Km値)を以下に示す手法により測定した。また、乳酸菌由来のL-乳酸脱水素酵素の対ピルビン酸基質親和性との比較を行った。

なお、対ピルビン酸基質親和性(Km値)の測定においては、最初に、精製されたL-乳酸脱水素酵素にピルビン酸、及びNADH、FBPを添加して酵素反応を行い、NADHの減少率を分光光度計(Ubest-55、日本分光)ABS:340nmにて測定し、各L-乳酸脱水素酵素活性を求めた。

20 次に、各ピルビン酸濃度におけるL-乳酸脱水素酵素活性の値をもとに、ピルビン酸飽和曲線及び各逆数から算出されるLineweaver-Burkプロットを作製し、L-乳酸脱水素酵素における対ピルビン酸基質親和性(ミカエリス定数、Km値)を求めた。

【0065】

25 精製されたウシ筋肉由来L-乳酸脱水素酵素0.05 μ g(SIGMA社製)にpH7.0に調製した50mM MOPS緩衝液(ナラカイ)、0.15mM NADH(SIGMA社製)、1mM FBP(SIGMA)を加えた溶液を、37℃下で2~3分保温した。

次に、濃度調製した0.01~100mMのピルビン酸(和光純薬)を加え、

なお、LDH活性は、以下の式(数5)により求めた。

$$\text{LDH活性値 (U/mg protein)} = \frac{\text{1分間の吸光度変化}}{0.0063} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{0.05 \mu\text{g}} \times \frac{200 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times \frac{1}{1000}$$

【 0 0 6 6 】

15 さらに、縦軸に $1/[V]$ 、横軸に $1/[S]$ と、各値の逆数から算出される Lineweaver-Burk プロットを作製した。本酵素についての本プロットを図 13 に示す。

Lineweaver-Burk プロットにおける $1/[V]$ 軸との交点が $1/V_{\max}$ 、 $1/[S]$ 軸との交点が $-1/K_m$ となることを利用して、対ピルビン酸濃度基質親和能 (K_m 値) を算出した。

【 0 0 6 7 】

各 Lineweaver-Burk プロットにより、ウシ筋肉由来の L-乳酸脱水素酵素の対ピルビン酸基質親和能は、0.1 mM であった。なお、本発明者らによれば、乳酸菌 *ビフィドバクテリウム・ロンガム* 由来の L-乳酸脱水素酵素の対ピルビン酸

25 基質親和性は 1.0 mM であるという知見がある。

【 0 0 . 6 8 】

ここで、乳酸菌ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*) 由来の L-乳酸脱水素酵素をコードする DNA を宿主に導入して高発現させた組

換え酵母におけるL-乳酸とアルコールの生産量を以下のとおりであった（発酵条件は、グルコース15%を含むYPD培地中での30℃、3日間であった）。

なお、当該乳酸菌由来の組換え酵母を得るためのベクター（pBTrp-PDC1P-LDH；7.11kb）及びその構築工程を図14及び図15に示す。

- 5 お、当該形質転換酵母においては、当該遺伝子は、宿主染色体上のPDC遺伝子座にノックインによりPDC1プロモーターにより制御可能に導入された。なお、この形質転換酵母は、当該L-乳酸脱水素酵素遺伝子が宿主染色体上の一对のPDC遺伝子座にそれぞれ導入された2コピー体であることが確認されている。なお、当該ベクターの構築及び酵母の形質転換の操作は、図14及び図15に示す
- 10 事項以外は、実施例3及び4に準じて行った。

【0069】

表3に示すように、この結果と実施例5において試験したウシ筋肉由来のL-乳酸脱水素酵素による結果と対比すると、ウシ筋肉由来LDH導入酵母によるL-乳酸生産量は、乳酸菌由来LDH導入酵母の約2倍であった。

15 【表3】

| | 生産量(%) | |
|--|--------|-------|
| | L-乳酸 | エタノール |
| ウシ筋肉由来LDH導入酵母 (対ピルビン酸基質親和能 0.1mM) | 4.92% | 5.01% |
| 乳酸菌Bifidobaacterium longum由来LDH導入酵母 (対ピルビン酸基質親和能 1.0mM) | 2.46% | 6.11% |

【0070】

（実施例7：酵母由来のピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和能（ミカエリス定数、Km値）の測定

- 20 酵母由来のピルビン酸脱炭酸酵素活性及び対ピルビン酸基質親和能（Km値）の測定においては、最初に、精製されたピルビン酸脱炭酸酵素にピルビン酸、及びNADH、チアミンを添加して酵素反応を行い、NADHの減少率を分光光度計（Ubest-55、日本分光）ABS：340nmにて測定し、酵母由来ピルビン酸脱炭酸酵素活性を求めた。

次に、各ピルビン酸濃度におけるピルビン酸脱炭酸酵素活性の値をもとに、ピルビン酸飽和曲線及び各逆数から算出される Lineweaver-Burk プロットを作製し、ピルビン酸脱炭酸酵素における対ピルビン酸基質親和能（ミカエリス定数、 K_m 値）を求めた。

5 【0071】

精製された酵母由来ピルビン酸脱炭酸酵素 $0.05 \mu\text{g}$ （SIGMA社製）に pH 7.0 に調製した 34 mM イミダゾール-HCl 緩衝液（和光純薬）、 0.15 mM NADH（SIGMA社製）、 0.2 mM Tiamine Pyrophosphate (SIGMA) を加えた溶液を 37°C 下で 2～3 分保温した。

- 10 次に、濃度調製した $0.01 \sim 100 \text{ mM}$ のピルビン酸（和光純薬）を加え、すばやく混和後、分光光度計（Ubsset-55、日本分光）にセットし、ABS: 340 nm における 1 分間の吸光度変化を求めた。

なお、PDC 活性は、以下の式（数 6）により求めた。

【数 6】

$$15 \quad \text{PDC 活性値 (U/mg protein)} = \frac{1 \text{ 分間の吸光度変化}}{0.0063} \times \frac{1000 \mu\text{g}}{0.05 \mu\text{g}} \times \frac{200 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}} \times \frac{1}{1000}$$

なお、本手法は、Pronk, J. T., Steensma, H. Y. and Dijken, J.P. Pyruvate, Metabolism in *Sccharomyces serevisiae*. YEAST, 1996, Vol.12, 1607-1633 に記載される方法に準じた。

【0072】

- 20 得られた PDC 活性をもとに、縦軸に $[V] = \text{PDC 酵素活性 (U/mg)}$ 、横軸に $[S] = \text{ピルビン酸濃度 (mM)}$ で示したピルビン酸飽和曲線を作成した。本グラフを図 16 に示す。

さらに、縦軸に $1/[V]$ 、横軸に $1/[S]$ と、各値の逆数から算出される Lineweaver-Burk プロットを作製した。これらのグラフを図 17 に示す。

- 25 Lineweaver-Burk プロットにおける $1/[V]$ 軸との交点が $1/V_{\text{max}}$ 、 $1/[S]$ 軸との交点が $-1/K_m$ となることを利用して、対ピルビン酸濃度基質親和能（ K_m 値）を算出した。

【0073】

Lineweaver-Burkプロットから、酵母由来のピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸 K_m 値は、0.346 mMであった。

実施例6におけるウシ由来L-乳酸脱水素酵素の対ピルビン酸 K_m 値0.1 mMと比較すると、3.46倍高かった。換言すれば、ウシ由来L-乳酸脱水素酵素は、酵母由来のピルビン酸脱炭酸酵素よりも3.46倍高い基質親和性を有していることがわかった。

また、ビフィドバクテリウム・ロンガム由来L-乳酸脱水素酵素の対ピルビン酸 K_m 値1.0 mMと比較すると、0.346倍であった。換言すれば、当該乳酸菌由来のL-乳酸脱水素酵素は、酵母由来のピルビン酸脱炭酸酵素の0.346倍の基質親和性しか有していないことがわかった。

【0074】

なお、本明細書中に引用された特許及び特許出願明細書を含めた刊行物は、各刊行物が明確にかつ個別に示されているかのように、その全体を引用により本明細書の一部とする。また、特願2001-286637、特願2002-128323、特願2001-287159、特願2002-128286、特願2002-65880、特願2002-65879の特許出願明細書は、各明細書が明確にかつ個別に示されているかのように、引用により本明細書の一部とする。

【0075】

産業上の利用分野

本発明によれば、ピルビン酸脱炭酸酵素遺伝子を有する宿主生物中でエタノール生産を制御し乳酸を安定的に大量生産させるための技術を提供することができる。

【0076】

「配列表フリーテキスト」

25 配列番号3：L-乳酸脱水素酵素をコードする修飾DNA

配列番号4：L-乳酸脱水素酵素をコードする修飾DNA

配列番号5～39：プライマー

請求の範囲

1. 形質転換体であって、

宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同等か
あるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵素活
性を有するタンパク質をコードするDNAが導入されている形質転換体。

2. 前記外来タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログで
ある、請求項1に記載の形質転換体。

3. 前記外来タンパク質は、配列番号1に示すアミノ酸配列からなるタンパク質
あるいはそのホモログである、請求項1に記載の形質転換体。

4. 前記外来タンパク質は、配列番号3に示すDNA配列によってコードされてい
る、請求項3に記載の形質転換体。

5. 前記外来タンパク質をコードするDNA配列として、配列番号4に示すDNA
配列を保持する、請求項4に記載の形質転換体。

6. 前記宿主生物は、サッカロマイセス属である、請求項1に記載の形質転換体。

7. 前記宿主生物は、サッカロマイセス・セレビシエである、請求項2に記載の
形質転換体。

8. 前記外来タンパク質をコードするDNAは、宿主染色体上のピルビン酸脱炭
酸酵素遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモ
ーターのホモログによって制御可能に導入されている、請求項1に記載の形質転換
体。

9. 前記外来タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログで
ある、請求項8に記載の形質転換体。

10. 前記宿主生物は、サッカロマイセス属である、請求項8に記載の形質転換
体。

11. 前記宿主生物は、サッカロマイセス・セレビシエである、請求項9に記載
の形質転換体。

12. 前記プロモーターは、ピルビン酸脱炭酸酵素1遺伝子のプロモーターであ
る、請求項8に記載の形質転換体。

1 3. 前記プロモーターとして、配列番号 2 記載の塩基配列からなる DNA ある
いはそのホモログを用いる、請求項 8 に記載の形質転換体。

1 4. 形質転換体であって、

宿主生物は、サッカロマイセス・セレビシエであり、

5 当該宿主生物に内在するピルビン酸脱炭酸酵素の対ピルビン酸基質親和性と同
等かあるいはそれを超える対ピルビン酸基質親和性を備える外来の乳酸脱水素酵
素活性を有するタンパク質をコードする DNA が導入されており、

10 前記外来タンパク質をコードする DNA は、宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸
酵素 1 遺伝子のプロモーターあるいは当該プロモーターと置換された当該プロモ
ーターのホモログによって制御可能に導入されている、形質転換体。

1 5. 前記外来タンパク質は、ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログ
である、請求項 1 4 に記載の形質転換体。

1 6. 形質転換体であって、

15 ウシ由来の乳酸脱水素酵素あるいはそのホモログをコードする DNA が、サッ
カロマイセス属の宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素 1 遺伝子のプロモーター
あるいは当該プロモーターと置換された当該プロモーターのホモログによって制
御可能に導入されており、宿主染色体上のピルビン酸脱炭酸酵素 1 の構造遺伝子
が破壊されている、形質転換体。

20 1 7. 前記宿主は、サッカロマイセス・セレビシエである、請求項 1 6 記載の形
質転換体。

1 8. 請求項 1 に記載の形質転換体を培養する工程と、

前記工程で得られる培養物から乳酸を分離する工程、
とを備える、乳酸の製造方法。

1 9. 請求項 1 4 に記載の形質転換体を培養する工程と、

25 前記工程で得られる培養物から乳酸を分離する工程、
とを備える、乳酸の製造方法。

| | | | | | | | | |
|-----|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|
| Phe | <u>UUU</u> | 26.0(146412) | <u>UCU</u> | 23.6(132621) | <u>UAU</u> | 18.8(105557) | <u>UGU</u> | 8.0(44797) |
| | <u>UUC</u> | 18.2(102353) | <u>UCC</u> | 14.2(79920) | <u>UAC</u> | 14.7(82477) | <u>UGC</u> | 4.7(26363) |
| | <u>UUA</u> | 26.4(148212) | <u>UCA</u> | 18.8(105618) | <u>UAA</u> | 1.0(5537) | <u>UGA</u> | 0.6(3456) |
| | <u>UUG</u> | 27.1(152577) | <u>UCG</u> | 8.6(48192) | <u>UAG</u> | 0.5(2629) | <u>UGG</u> | 10.3(58084) |
| | | | | | | | | |
| Leu | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| Ile | <u>AUU</u> | 30.2(169875) | <u>ACU</u> | 20.2(113664) | <u>AUU</u> | 36.0(202449) | <u>AGU</u> | 14.2(79666) |
| | <u>AUC</u> | 17.1(96127) | <u>ACC</u> | 12.6(70760) | <u>AAC</u> | 24.9(140174) | <u>AGC</u> | 9.7(54339) |
| | <u>AUA</u> | 17.8(100079) | <u>ACA</u> | 17.7(99786) | <u>AAA</u> | 42.1(236838) | <u>AGA</u> | 21.3(119693) |
| | <u>AUG</u> | 20.9(117420) | <u>ACG</u> | 8.0(44816) | <u>AAG</u> | 30.8(173181) | <u>AGG</u> | 9.3(52060) |
| | | | | | | | | |
| Met | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| | | | | | | | | |
| Val | <u>GUU</u> | 22.0(123771) | <u>GCU</u> | 21.1(118604) | <u>GAU</u> | 37.8(212747) | <u>GGU</u> | 23.9(134536) |
| | <u>GUC</u> | 11.6(65195) | <u>GCC</u> | 12.6(70752) | <u>GAC</u> | 20.3(114444) | <u>GGC</u> | 9.7(54619) |
| | <u>GUA</u> | 11.8(66110) | <u>GCA</u> | 16.2(91026) | <u>GAA</u> | 45.9(258028) | <u>GGA</u> | 10.9(61498) |
| | <u>GUG</u> | 10.7(60001) | <u>GCG</u> | 6.1(34530) | <u>GAG</u> | 19.1(107579) | <u>GGG</u> | 6.0(33624) |
| | | | | | | | | |

FIG. 1

| | | | |
|--------------------------------|-----|---|-----|
| Bovine LDH modified LDH KCB | 1 | ATGGCAACTCTCAAGGATCAGCTGATTCAAGATCTTCTTAAGGAAGAACATGTGCCCCAG | 60 |
| | 1 |T...T.G..A....AT.....A...T.GT.G.....T...A..A | 60 |
| | | ***** ** * ** ***** ***** ** * * ** ***** ** ** | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 61 | AATAAGATTACAATTGTTGGGGTTGGTCTGTTGGCATGGCCTGTGCCATCAGTATCTTA | 120 |
| | 61 |A.....T.....T.....T.....T.....T.....T.TTC...T..G | 120 |
| | | ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** ** * | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 121 | ATGAAGGACTTGGCAGATGAAGTTGCTCTTGTGATGTCATGGAAGATAAACTGAAGGGA | 180 |
| | 121 |A..T.....T.....T.G.....T.....T.....T...A..T | 180 |
| | | ***** ** ***** ***** * ***** ***** ***** ** * | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 181 | GAGATGATGGATCTCCAACATGGCAGCCTTTTCCTTAGAACACCAAAAATTGTCTCTGGC | 240 |
| | 181 | ..A.....T.G.....TTCTT.G..TT.G....T.....T.....T | 240 |
| | | ** ***** * ***** * ** * ***** ***** ***** ** * | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 241 | AAAGACTATAATGTGACAGCAAACTCCAGGCTGGTTATTATCAGAGCTGGGGCACGTGAG | 300 |
| | 241 |T.....T..T..T..T..AT.....T..T....T..TA.A..A | 300 |
| | | ***** ***** ** ** * ** * ** ***** ***** ** * ** | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 301 | CAAGAGGGAGAGAGCCGTCTGAATTTGGTCCAGCGTAACGTGAACATCTTTAAATTCATC | 360 |
| | 301 |A..T..ATCTA.AT.....T..AA.A..T..T..T.....T..T | 360 |
| | | ***** ** ** * ***** ** * ** * ** ***** ** * | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 361 | ATTCTAATATTGTAATAACAGCCCAAATTGCAAGTTGCTTGTGTTTCCAATCCAGTC | 420 |
| | 361 |A.....T.....TTCT.....T..A..T.G.....T.....T | 420 |
| | | ***** ***** ***** ***** ***** ** ** * ***** ***** | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 421 | GATATTTTGACCTATGTGGCTTGGGAAGATAAGTGGCTTTCCAAAAACCGTGTATTGGA | 480 |
| | 421 |T.....T.....A..TTC...T.....A.....TA.A.....T | 480 |
| | | ***** ***** ***** ** *** ***** ***** * ***** | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 481 | AGTGGTTGCAATCTGGATTGAGCTCGCTTCGGTTATCTCATGGGGAGAGGCTGGGAGTT | 540 |
| | 481 | TC.....T..T.....T...A.A..TA.A...T.G....T..A..AT...T.. | 540 |
| | | ***** ** ***** ** * ** * ** * ***** ** ** **** * | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 541 | CACCCATTAAAGCTGCCATGGGTGGATCCTTGGGGAGCATGGTGACTCTAGTGTGCTGTGA | 600 |
| | 541 | ..T.....GTCT..T.....T.....TT.G..T..A.....T..TC...T..A..T | 600 |
| | | ** ***** ** ***** ***** * ** * ***** ***** ** ** * | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 601 | TGGAGTGGAGTGAATGTTGCTGGTGTCTCCCTGAAGAATTTACACCTGAATTAGGCACT | 660 |
| | 601 | ...TC...T..T.....T..TT....A....G..T..A....G..T... | 660 |
| | | ** * ** * ***** ***** ** ***** ***** ** ** ***** ** * | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 661 | GATGCAGATAAGGAACAGTGGAAAGCGGTTACAAACAAGTGGTTGACAGTGCTTATGAG | 720 |
| | 661 |T.....A....A.....T.....T.....T.....TTC.....A | 720 |
| | | ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 721 | GTGATCAAACCTGAAAGGCTACACATCCTGGGCCATTGGACTGTCAGTGGCCGATTTGGCA | 780 |
| | 721 | ..T..T...T.....T..T..T..T.....T.....TT...T..T..T.....T | 780 |
| | | ** ** ** ***** ** ** * ** ***** ***** ***** ** ** ***** | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 781 | GAAAGTATAATGAAGAATCTTAGGCGGGTGCATCCGATTTCCACCATGATTAAGGGTCTC | 840 |
| | 781 | ...TC...T.....A...T.G..AA.A..T.....A....T..T.....A...T.G | 840 |
| | | *** ** ***** ** * ** * ** ***** ***** ** ***** ** * | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 841 | TATGGAATAAAAGAGGATGTCTTCCTTAGTGTTCTTGCATCTTGGGACAGAATGGAATC | 900 |
| | 841 |T..T.....A....T..TT.GTC.....A..T..T....T..A....T..T | 900 |
| | | ***** ** ***** ***** ** * ***** ** ** ***** ** ***** ** | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 901 | TCAGACGTTGTGAAAGTGACTCTGACTCATGAAGAAGAGGCCCTGTTTGAAGAAGAGTGCA | 960 |
| | 901 | ..T..T....T.....T..T.....T.....T.....T.....T.....T.....T | 960 |
| | | ** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ** * | |
| Bovine LDH modified LDH KCB | 961 | GATACACTTTGGGGATCCAGAAAGAACTGCAGTTTAA | 999 |
| | 961 |TT.G....T..T..A.....T.....A..... | 999 |
| | | ***** * ***** ** * ***** ***** ***** ***** | |

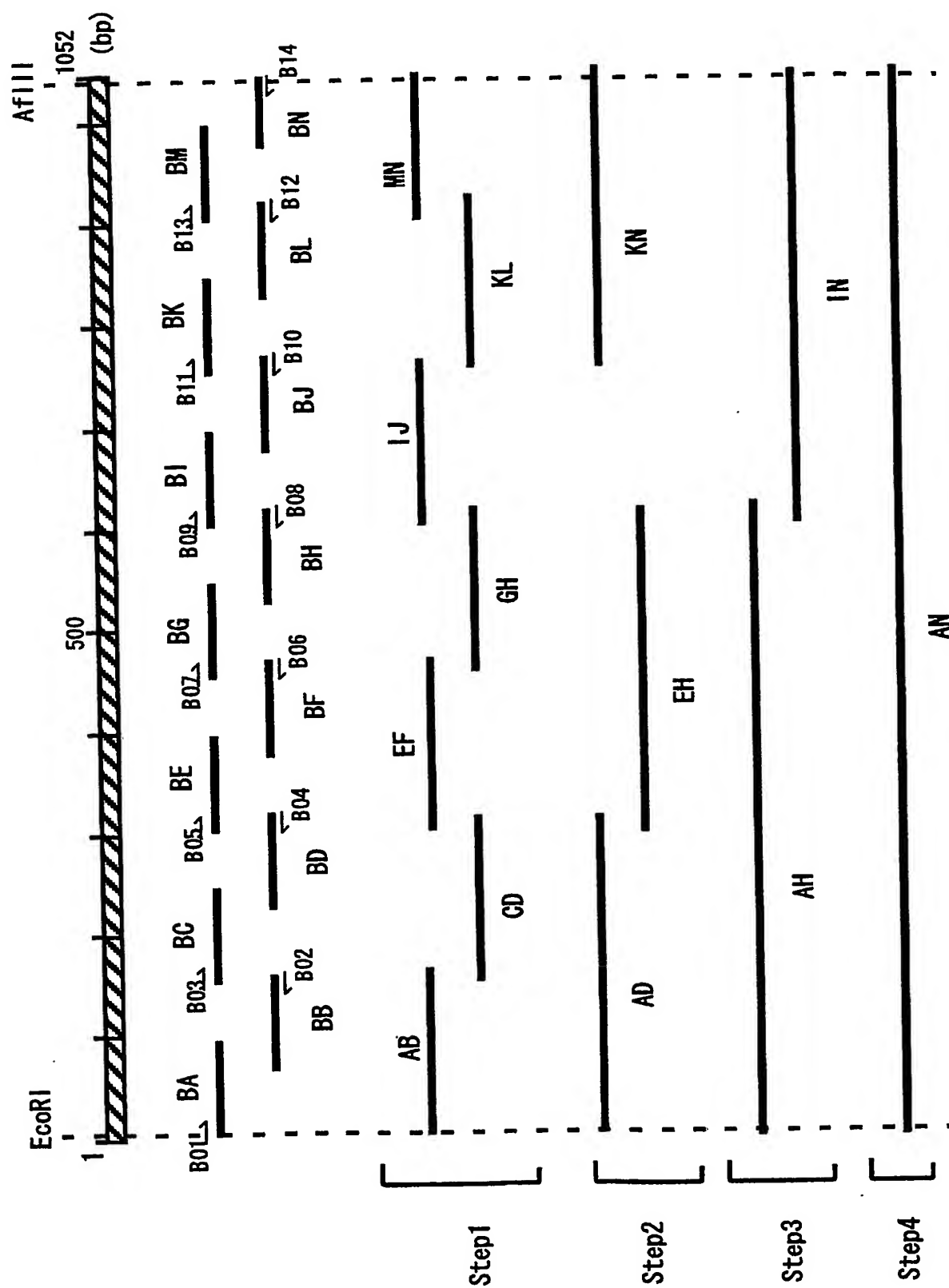
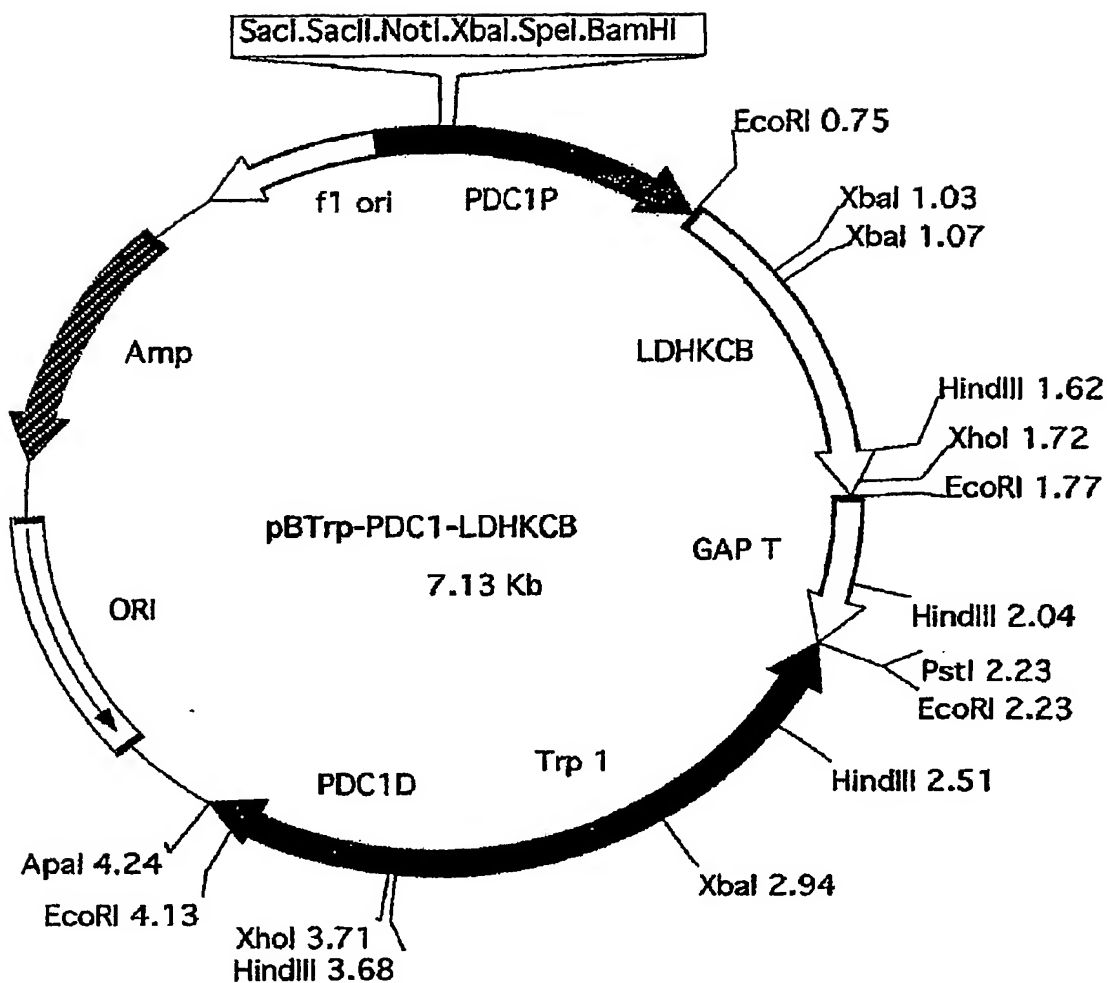


FIG. 3



プラスミドの名称: pBTrp-PDC1-LDHKCB
 プラスミドの大きさ: 7.13 kb

FIG. 4

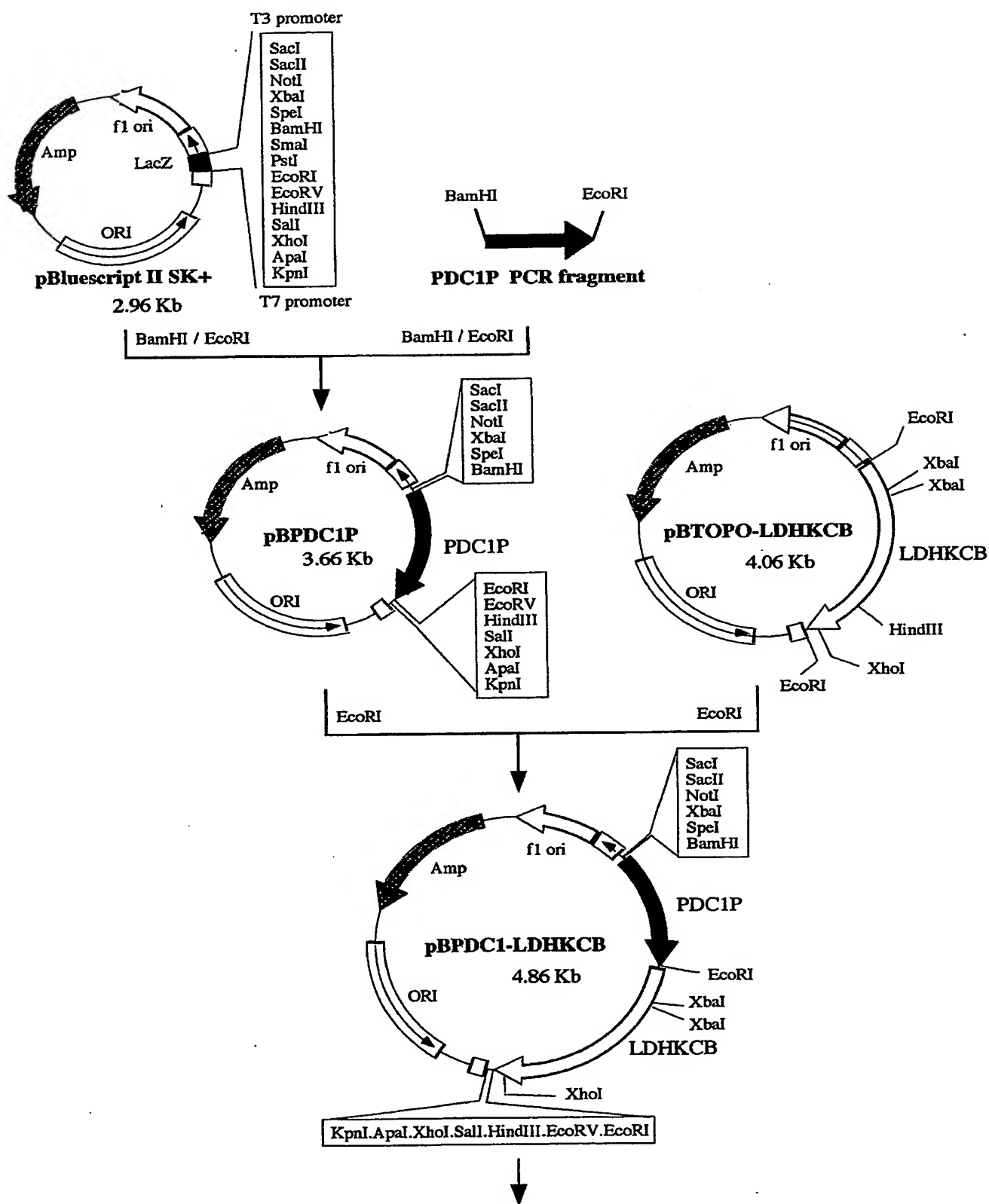


FIG. 5

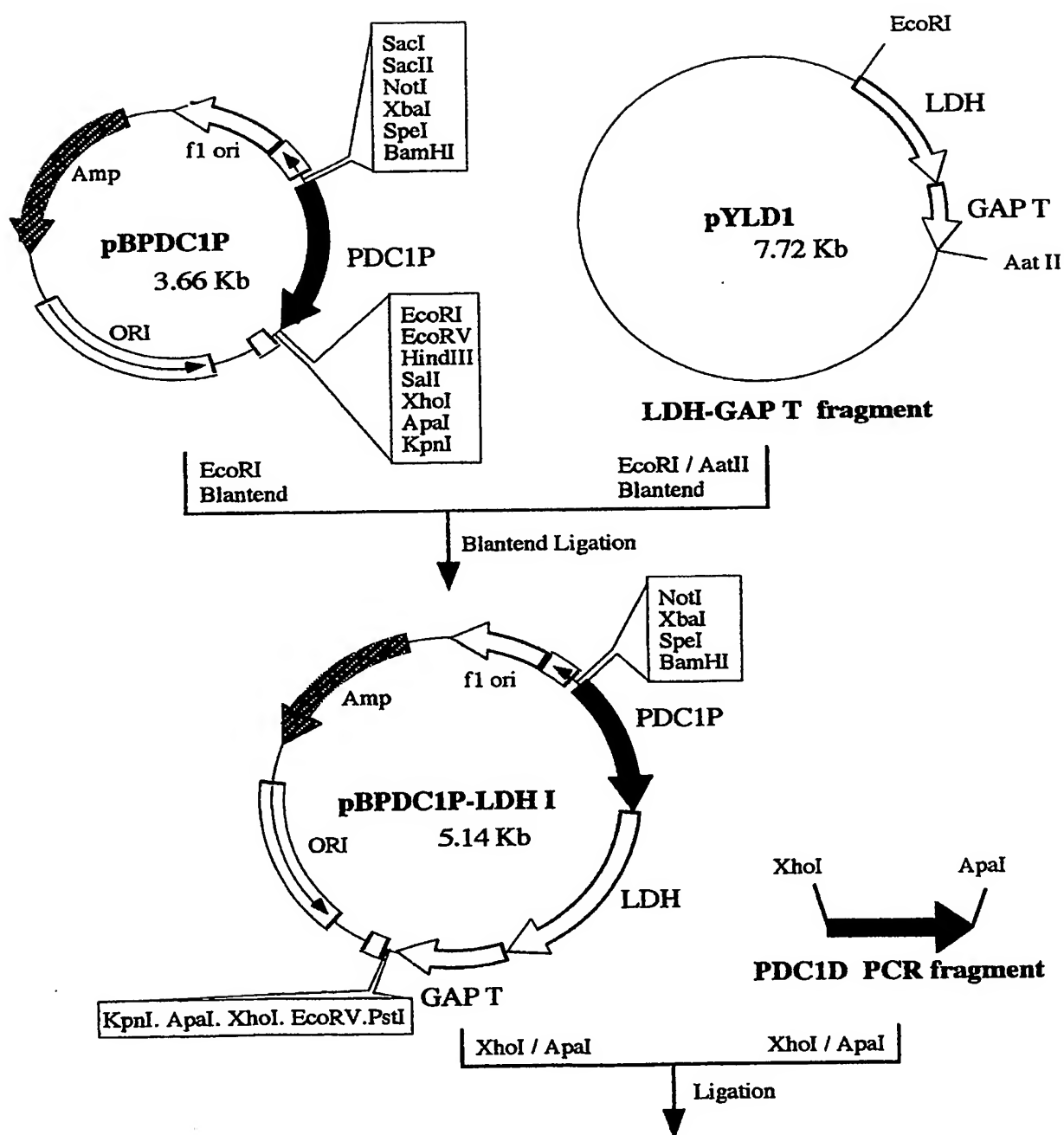
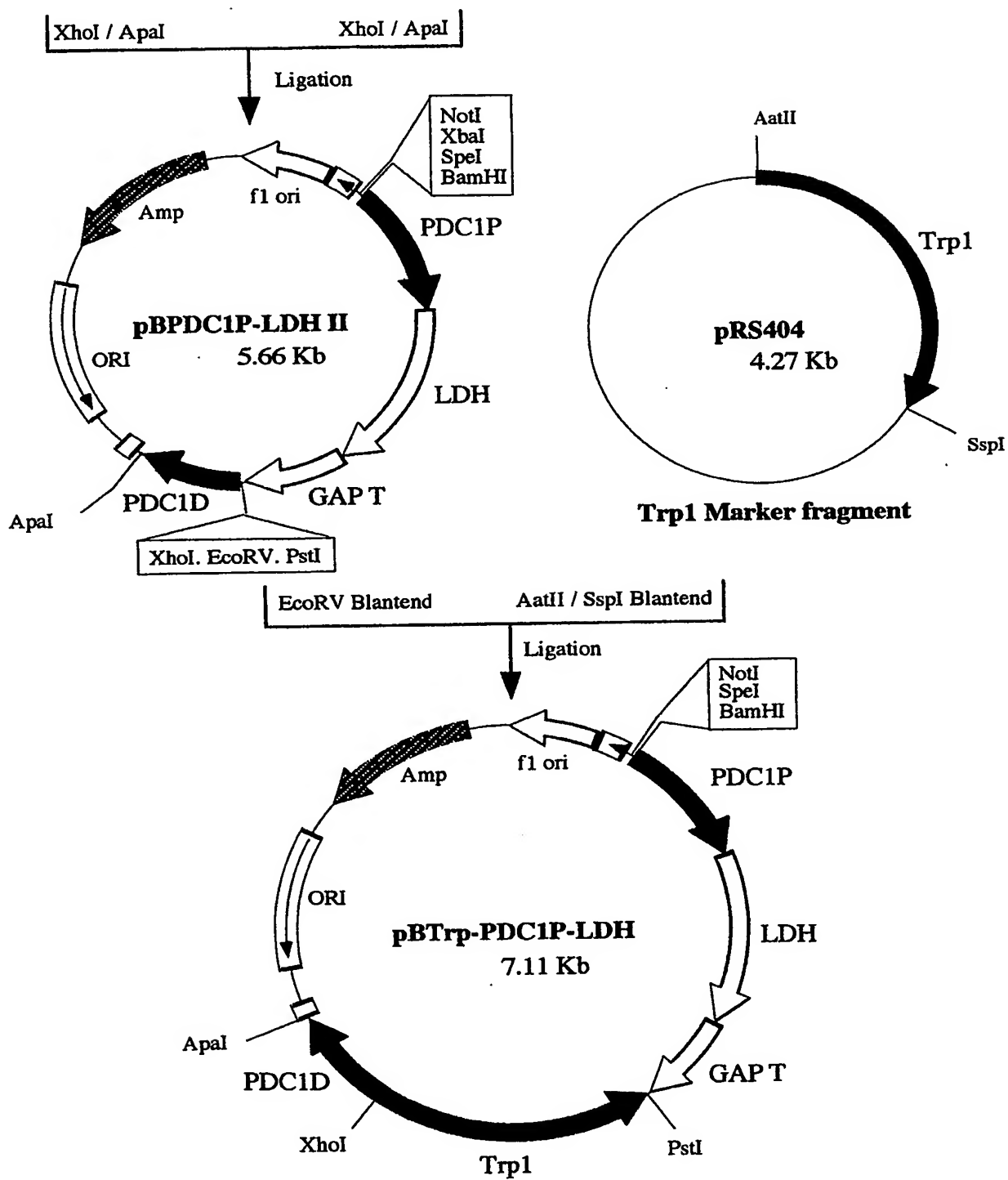


FIG. 6

pBPDC1P-LDH I**PDC1D PCR fragment****FIG. 7**

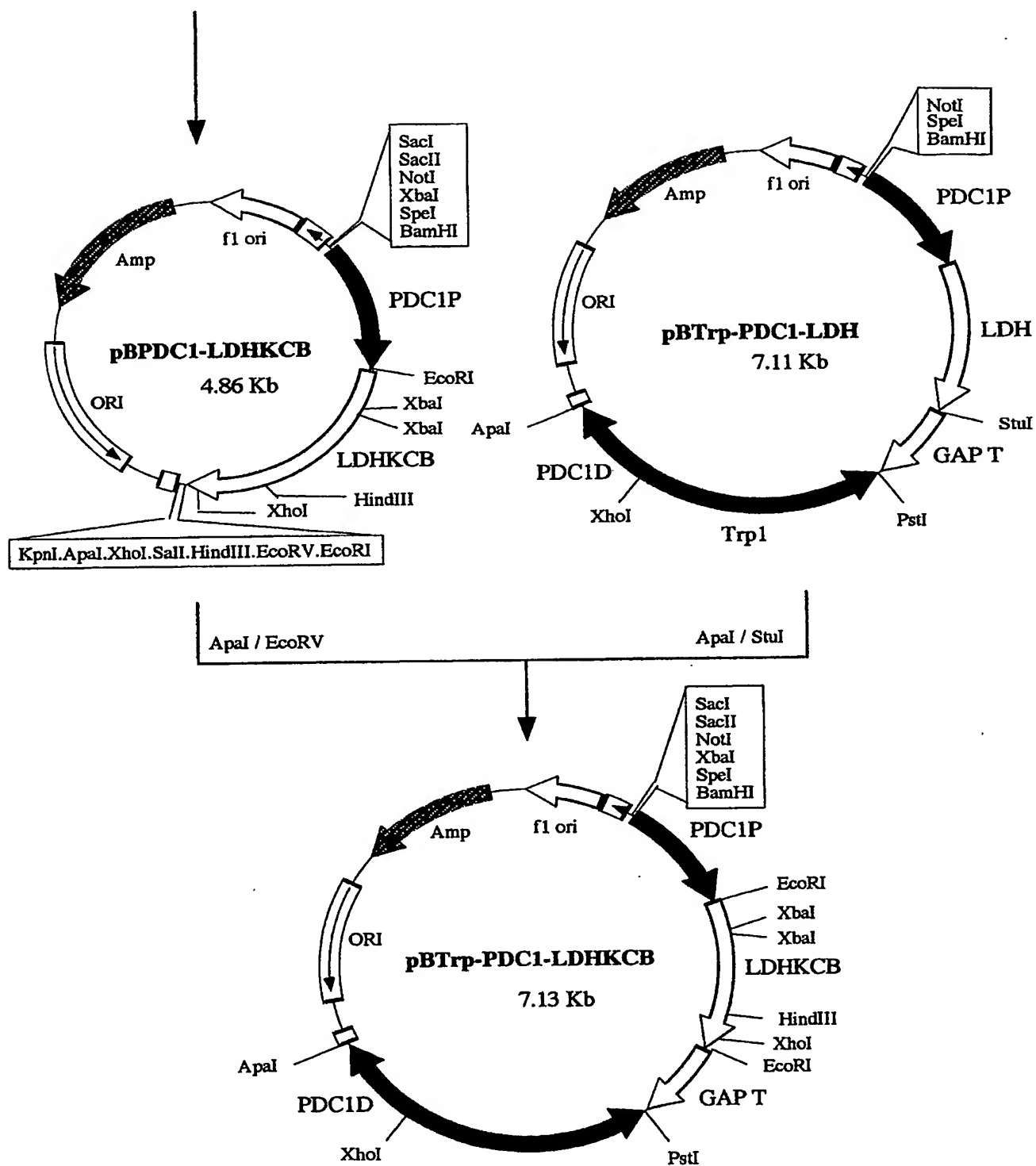


FIG. 8

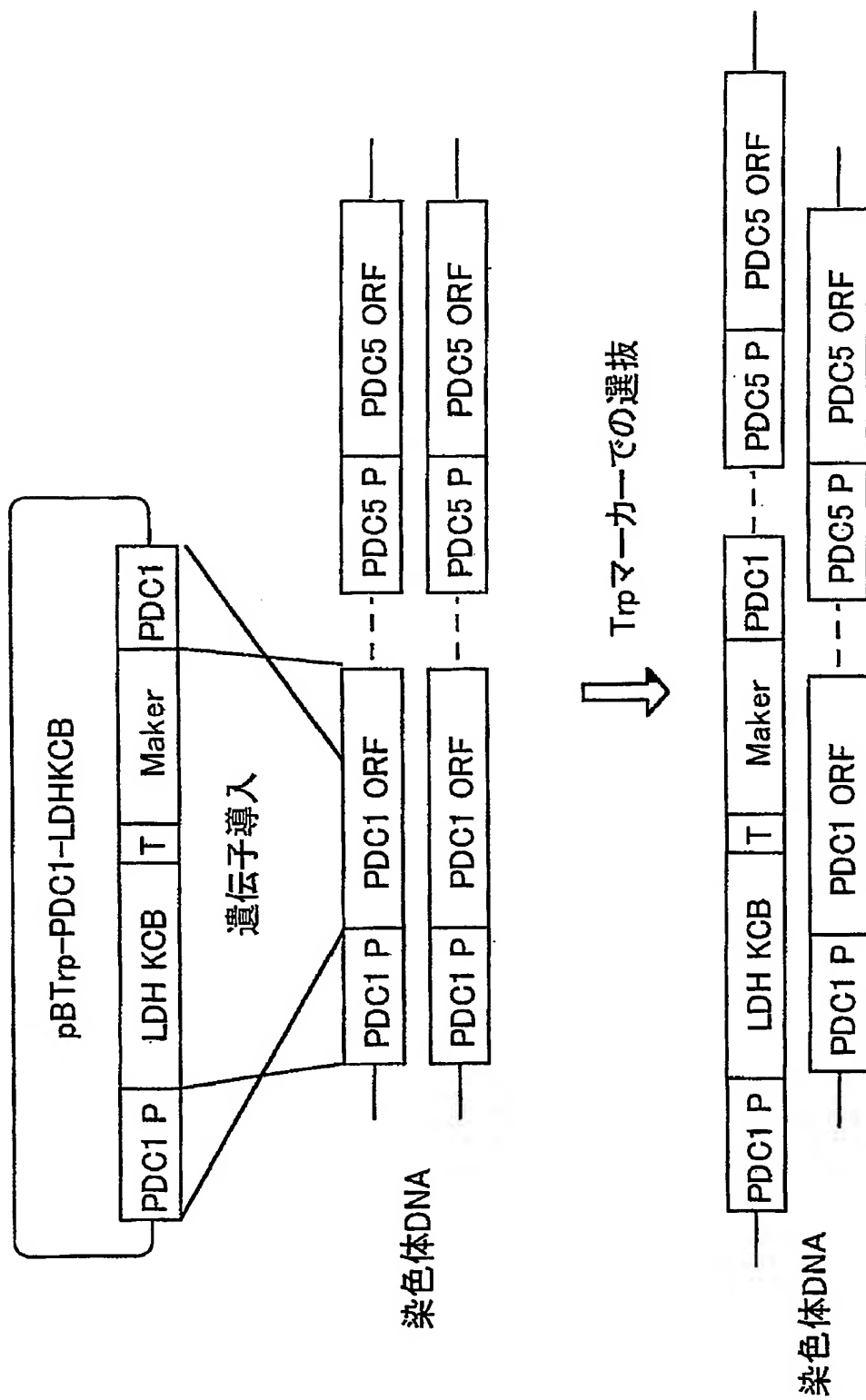


FIG. 9

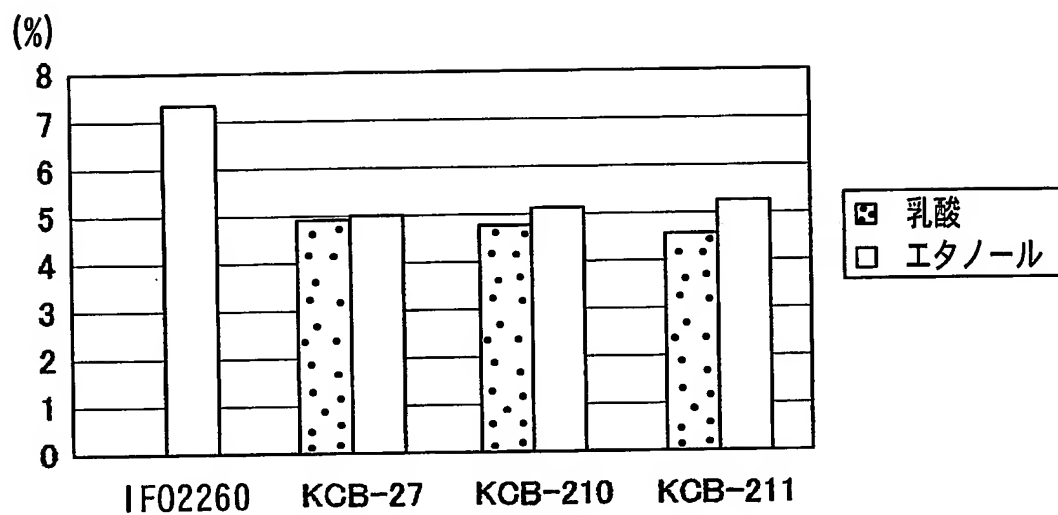


FIG. 10

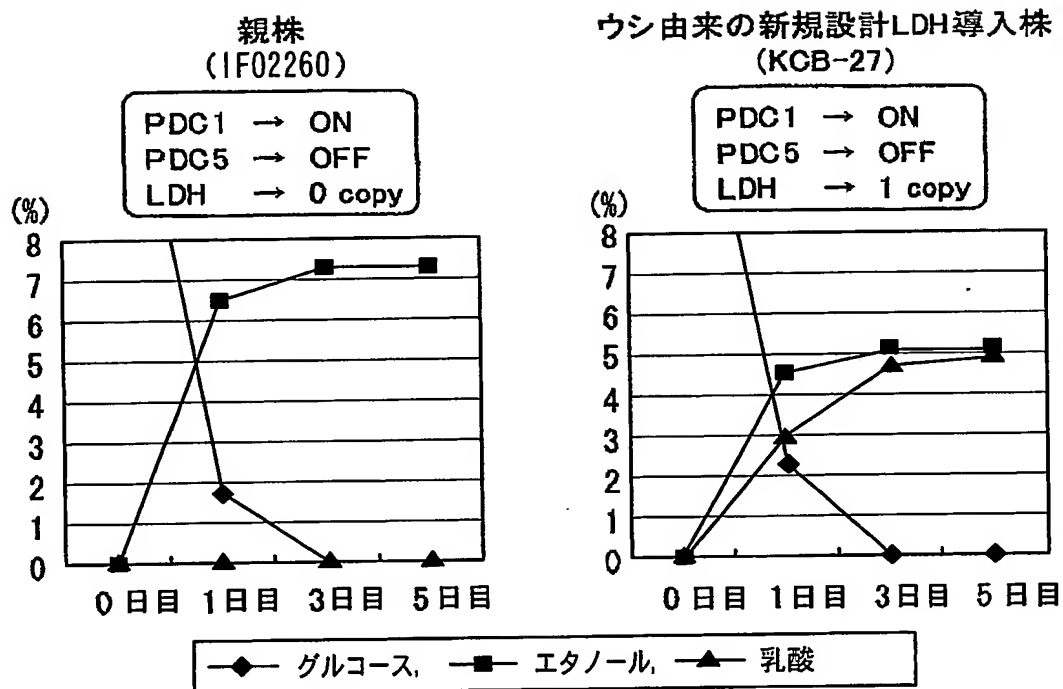


FIG. 11

ウシ筋肉由来L-乳酸脱水素酵素 (SIGMA) $\rightarrow K_m=0.1\text{mM}$

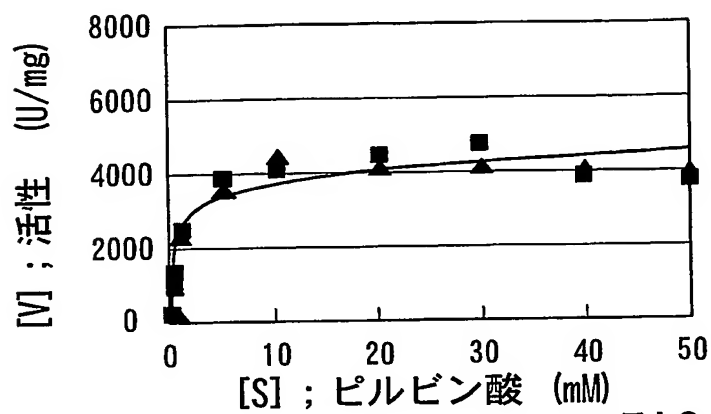


FIG. 12

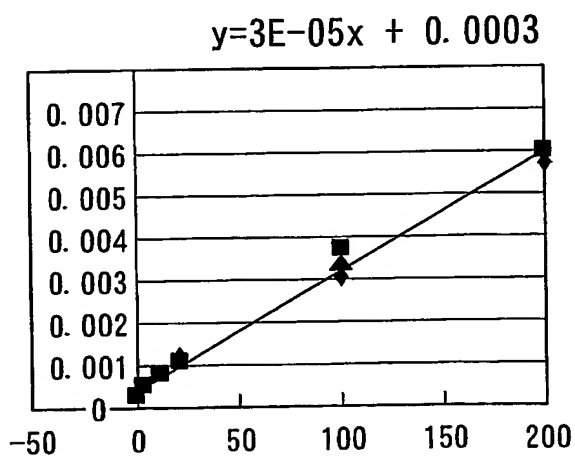


FIG. 13

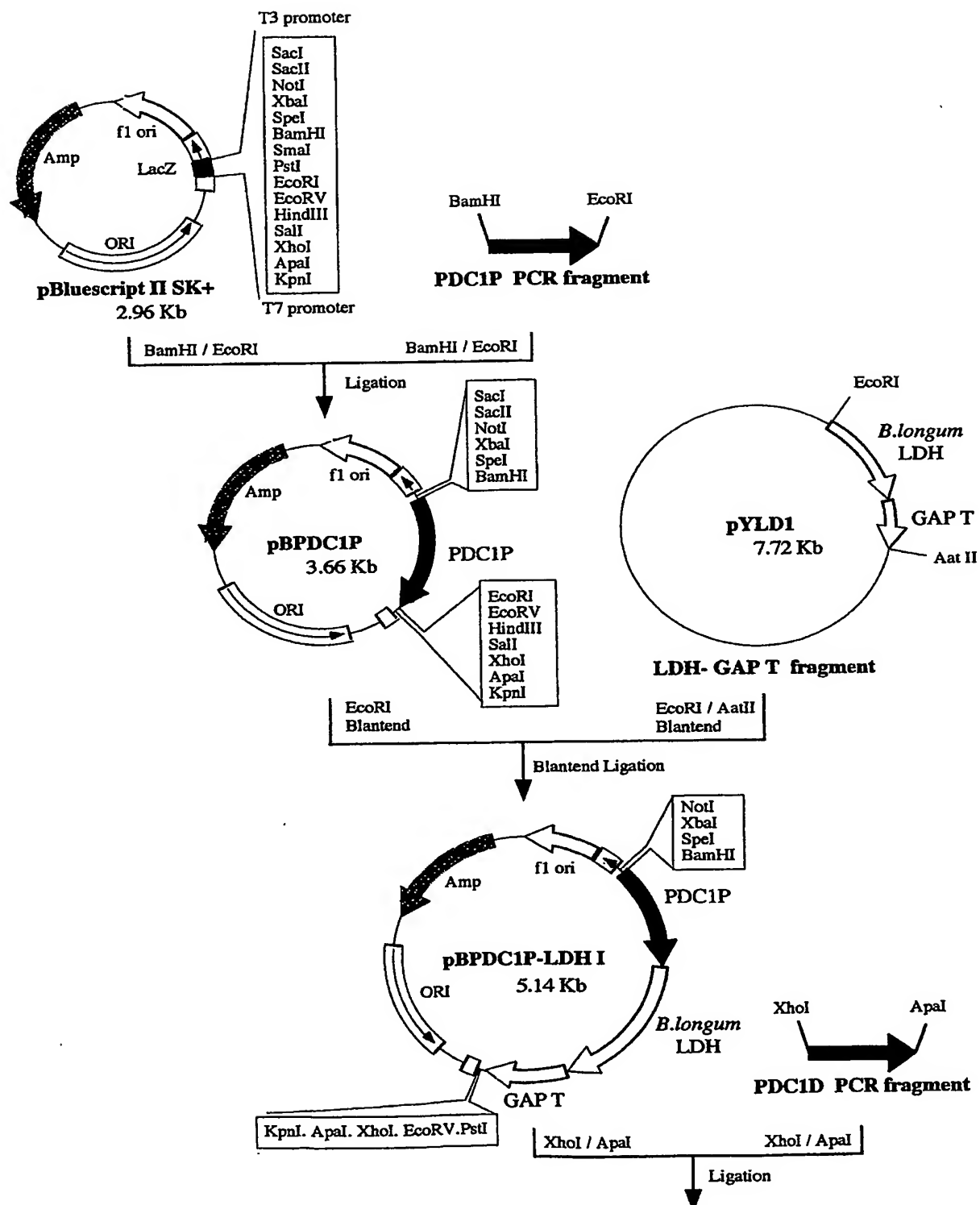
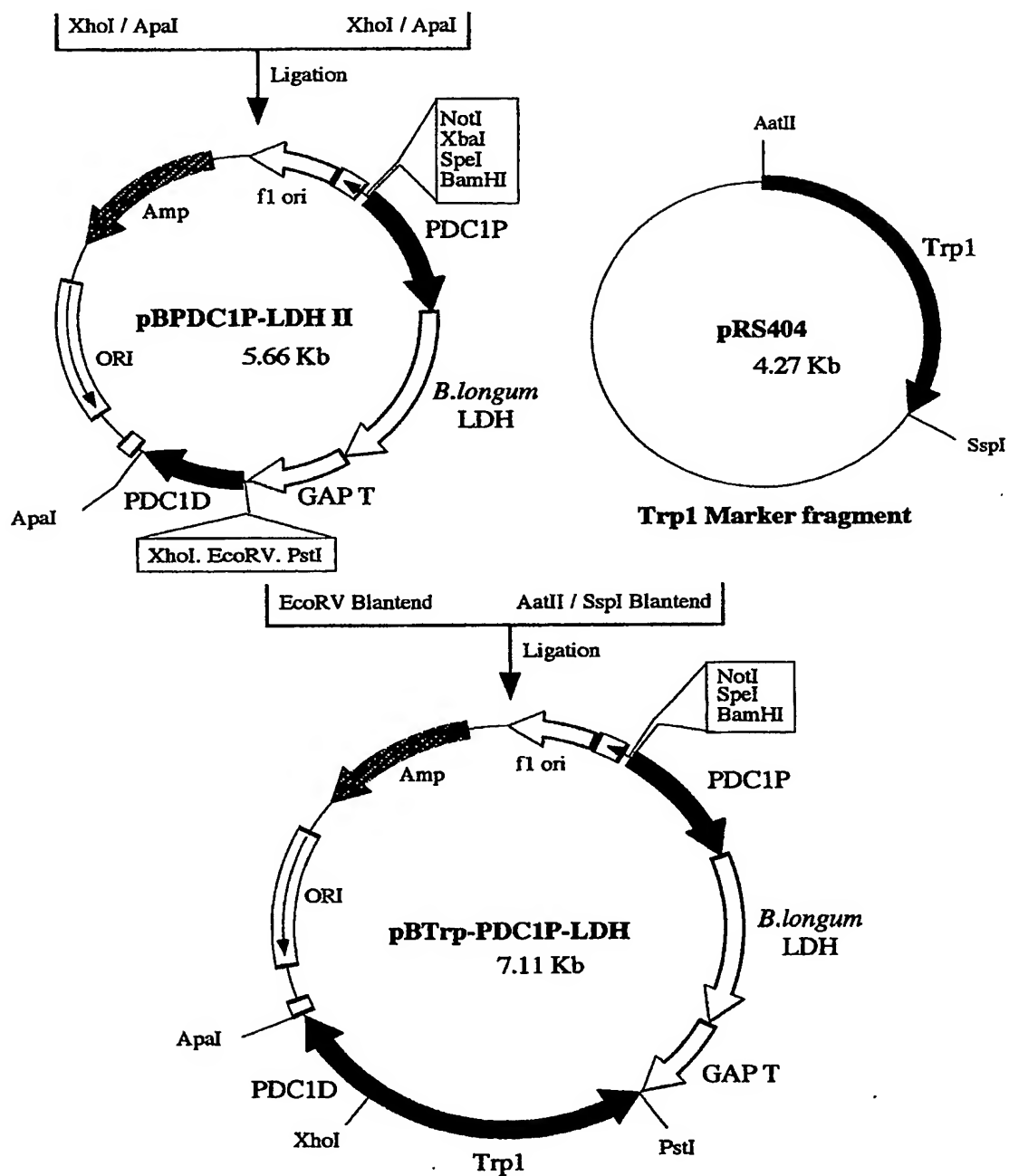


FIG. 14

pBPDC1P-LDH I**PDC1D PCR fragment****FIG. 15**

酵母由来ピルビン酸脱炭酸酵素 (SIGMA) \rightarrow $K_m=0.346\text{mM}$

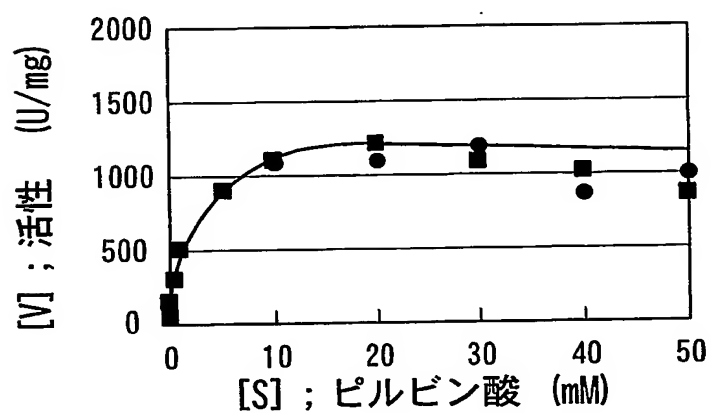


FIG. 16

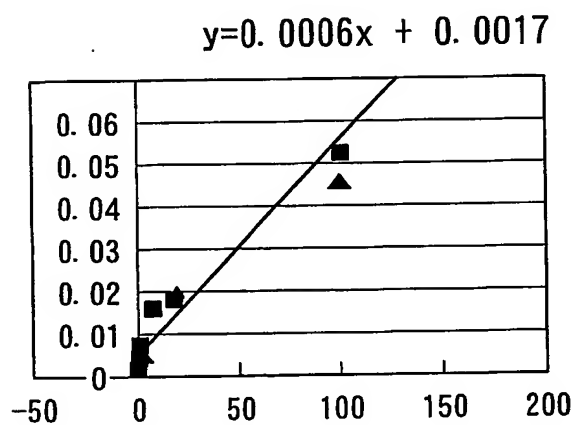


FIG. 17

SEQUENCE LISTING

<110> Toyota Jidosha Kabushiki Kaisha

5

<120> Method of Controlling Ethanol production

<130> PCTJP20007 (TSN2002-299-WO-00)

10 <140>

<141>

<150> JP2002-65880

<151> 2002-03-11

15

<160> 39

<170> PatentIn Ver. 2.1

20 <210> 1

<211> 332

<212> PRT

25

<213> Bovine

<400> 1

Met Ala Thr Leu Lys Asp Gln Leu Ile Gln Asn Leu Leu Lys Glu Glu

5 1 5 10 15

His Val Pro Gln Asn Lys Ile Thr Ile Val Gly Val Gly Ala Val Gly

20 25 30

10 Met Ala Cys Ala Ile Ser Ile Leu Met Lys Asp Leu Ala Asp Glu Val

35 40 45

Ala Leu Val Asp Val Met Glu Asp Lys Leu Lys Gly Glu Met Met Asp

50 55 60

15

Leu Gln His Gly Ser Leu Phe Leu Arg Thr Pro Lys Ile Val Ser Gly

65 70 75 80

Lys Asp Tyr Asn Val Thr Ala Asn Ser Arg Leu Val Ile Ile Thr Ala

20 85 90 95

Gly Ala Arg Gln Gln Glu Gly Glu Ser Arg Leu Asn Leu Val Gln Arg

100 105 110

25 Asn Val Asn Ile Phe Lys Phe Ile Ile Pro Asn Ile Val Lys Tyr Ser

115 120 125

Pro Asn Cys Lys Leu Leu Val Val Ser Asn Pro Val Asp Ile Leu Thr

130 135 140

Tyr Val Ala Trp Lys Ile Ser Gly Phe Pro Lys Asn Arg Val Ile Gly
145 150 155 160

5 Ser Gly Cys Asn Leu Asp Ser Ala Arg Phe Arg Tyr Leu Met Gly Glu
165 170 175

Arg Leu Gly Val His Pro Leu Ser Cys His Gly Trp Ile Leu Gly Glu
180 185 190

10 His Gly Asp Ser Ser Val Pro Val Trp Ser Gly Val Asn Val Ala Gly
195 200 205

Val Ser Leu Lys Asn Leu His Pro Glu Leu Gly Thr Asp Ala Asp Lys
15 210 215 220

Glu Gln Trp Lys Ala Val His Lys Gln Val Val Asp Ser Ala Tyr Glu
225 230 235 240

20 Val Ile Lys Leu Lys Gly Tyr Thr Ser Trp Ala Ile Gly Leu Ser Val
245 250 255

Ala Asp Leu Ala Glu Ser Ile Met Lys Asn Leu Arg Arg Val His Pro
260 265 270

25 Ile Ser Thr Met Ile Lys Gly Leu Tyr Gly Ile Lys Glu Asp Val Phe
275 280 285

Leu Ser Val Pro Cys Ile Leu Gly Gln Asn Gly Ile Ser Asp Val Val

290

295

300

Lys Val Thr Leu Thr His Glu Glu Glu Ala Cys Leu Lys Lys Ser Ala

305

310

315

320

5

Asp Thr Leu Trp Gly Ile Gln Lys Glu Leu Gln Phe

325

330

10 <210> 2

<211> 971

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

15 <400> 2

aagggtagcc tcccataac ataaactcaa taaaatatat agtcttcaac ttgaaaaagg 60

aacaagctca tgcaaagagg tggtagccgc acgccgaaat gcatgcaagt aacctattca 120

aagtaataac tcatacatgt ttcatgaggg taacaacatg cgactgggtg agcatatgct 180

ccgctgatgt gatgtgcaag ataaacaagc aagacggaaa ctaacttctt ctcatgtaa 240

20 taaacacacc ccggttttat ttacctatct ttaaacttca acaccttata tcataactaa 300

tatttcttga gataagcaca ctgcacccat accttctta aaagcgtagc ttccagtttt 360

tggtaggttc ggcttcttc ccgattccgc ccgctaaacg catatitttg ttgcctgggtg 420

gcatttgcaa aatgcataac ctatgcattt aaaagattat gtatgctctt ctgacttttc 480

gtgtgatgaa gctcgtggaa aaaatgaata atttatgaat ttgagaacaa ttctgtgttg 540

25 ttacggtatt ttactatgga ataattaatc aattgaggat ttatgcaa tatcgtttga 600

atatttttcc gaccttttga gtacttttct tcataattgc ataatttgt ccgctgcccc 660

tttttctgtt agacggtgtc ttgatctact tgctatcggt caacaccacc ttattttcta 720

actatttttt ttttagctca ttgaatcag cttatgggtg tggcacattt ttgcataaac 780

ctagctgtcc tcgttgaaca taggaaaaaa aaatatatta acaaggctct ttcactctcc 840

tigcaatcag atttgggttt gttcccttta ttttcatatt tcttgtcata ttcctttctc 900
aattattatt ttctactcat aaccacacgc aaaataacac agtcaaata atcaaagatc 960
ccccaattct c 971

5

<210> 3

<211> 999

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Modified DNA
coding lactate dehydrogenase

15 <400> 3

atggctactt tgaaagatca attgattcaa aatttgttga aagaagaaca tgttccacaa 60
aataaaatta ctattgttgg tgttggtgct gttggtatgg ctgtgctat ttctattttg 120
atgaaagatt tggctgatga agttgctttg gttgatgtta tggaagataa attgaaaggt 180
gaaatgatgg atttgcaaca tggttctttg tttttgagaa ctccaaaaat tgtttcttgg 240
20 aaagattata atgttactgc taattctaga ttggttatta ttactgctgg tgctagacaa 300
caagaagggtg aatctagatt gaatttgggt caaagaaatg ttaatatatt taaatttatt 360
attccaaata ttgttaaata ttctccaaat tgtaaatgtt tggttgtttc taatccagtt 420
gatattttga cttatgttgc ttggaaaatt tcttggtttc caaaaaatag agttattgg 480
tcttggttgta atttggaattc tgctagattt agataattga tgggtgaaag attgggtggt 540
25 catccattgt cttgtcatgg ttggattttg ggtgaacatg gtgattcttc tgttccagtt 600
tggctctggtg ttaatgttgc tgggttttct ttgaaaaatt tgcattccaga attgggtact 660
gatgctgata aagaacaatg gaaagctgtt cataaacaag ttgttgattc tgcttatgaa 720
gttattaaat tgaaaggtta tacttcttgg gctattgggt tgtctgttgc tgatttggct 780
gaatctatta tgaaaaattt gagaagagtt catccaattt ctactatgat taaaggtttg 840

tatggtatta aagaagatgt tttttgtct gticcatgia ttttgggtca aaatggtatt 900
tctgatgttg ttaaagttac ttgactcat gaagaagaag cttgtttgaa aaaatctgct 960
gatactttgt ggggtattca aaaagaattg caattttaa 999

5

<210> 4

<211> 1052

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Modified DNA
coding lactate dehydrogenase

15 <400> 4

acagaattca caatggctac ttigaaagat caattgattc aaaatttggt gaaagaagaa 60
catgttccac aaaataaaat tactattggt ggtgttggtg ctgttggtat ggcttgtgct 120
atttctatgt tgaatgaaaga ttggctgat gaagttgctt tggttgatgt tatggaagat 180
aaattgaaag gtgaaatgat ggatttgcaa catggttctt tgtttttgag aacitcaaaa 240
20 attgtttctg gtaaagatta taatgttact gctaattcta gattggttat tattactgct 300
ggtgctagac aacaagaagg tgaatctaga ttgaatttgg ttcaaagaaa tgtaaatatt 360
tttaaattta ttattccaaa tatgtttaa tattctccaa attgtaaatt gttggttggt 420
tctaattccag ttgatatttt gacttatgtt gcttggaaaa tttctggttt tccaaaaaat 480
agagttattg gttctggttg taatttggat tctgctagat ttagatattt gatgggtgaa 540
25 agattgggtg ttcattccatt gtcttgcac ggttggattt tgggtgaaca tgggtattct 600
tctgttccag ttgggtctgg tgtaaatgtt gctggtgttt ctttgaaaaa ttgcatcca 660
gaattgggtg ctgatgctga taaagaacaa tggaaagctg ttcataaaca agttgttgat 720
tctgcttatg aagttattaa attgaaagg tatacttctt gggctatttg tttgtctgtt 780
gctgatttgg ctgaatctat tatgaaaaat ttgagaagag ttcattccat ttctactatg 840

attaaagggtt tgtatgggtat taaagaagat gttttttgt ctgttccatg tattttgggt 900
caaaatggta tttctgatgt tgttaaagtt actttgactc atgaagaaga agcttgtttg 960
aaaaaatctg ctgatacttt gtgggggtatt caaaaagaat tgcaatttta ataactcgag 1020
cttggttgaa cacgttgcca aggccttaagt ga 1052

5

<210> 5

<211> 100

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

15 <400> 5

acagaattca caatggctac ttgaaagat caatgattc aaaatttggt gaaagaagaa 60
catgttccac aaaataaaat tactattggt ggtgttggtg 100

20 <210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 6

acagaattca caatggctac

20

<210> 7

<211> 100

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

10

<400> 7

atgataacaa ccacaaccac gacaaccata ccgaacacga taaagataaa actactttct 60
aaaccgacta cttcaacgaa accaactaca ataccttcta 100

15

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 8

25 atgataacaa ccacaaccac

20

<210> 9

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 9

tggttgatgt tatggaagat aaattgaaag gtgaaatgat ggatttgcaa catggttctt 60
tgtttttgag aactccaaaa attgtttctg gtaaagatta 100

10

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

20 <400> 10

tggttgatgt tatggaagat 20

<210> 11

25 <211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 11

taacaaagac catttctaatt attacaatga cgattaagat ctaaccaata ataatgacga 60
5 ccacgatctg ttgttcttcc acttagatct aacttaaacc 100

<210> 12

<211> 21

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

15

<400> 12

taacaaagac catttctaatt a 21

20 <210> 13

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25 <220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 13

tgaatctaga ttgaatttgg ttcaaagaaa tgtaatatatt tttaaattta ttattccaaa 60

tattgtttaa tattctccaa attgtaaatt gttggttgtt

100

<210> 14

5 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 14

tgaatctaga ttgaatttgg t

21

15

<210> 15

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 15

25 taacatttaa caaccaacaa agattaggtc aactataaaa ctgaatacaa cgaacctttt 60

aaagaccaaa aggtttttta tctcaataac caagaccaac

100

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 16

taacatttaa caaccaacaa a

21

10

<210> 17

<211> 100

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

20 <400> 17

agagttattg gtcttggttg taatttggat tctgctagat ttagatattt gatgggtgaa 60

agattgggtg ttcattccatt gtcttgcatt ggttggattt

100

25 <210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 18

5 agagttattg gttctggtt t

21

<210> 19

<211> 100

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

15

<400> 19

cagaacagta ccaacctaaa acccacttgt accactaaga agacaaggtc aaaccagacc 60

acaattacaa cgaccacaaa gaaacttttt aaacgtaggt 100

20

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 20

cagaacagta ccaacctaaa a

21

<210> 21

5 <211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

10 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 21

ctttgaaaaa ttgcatcca gaattgggta ctgatgctga taaagaacaa tggaaagctg 60
ttcataaaca agttgttgat tcgcttatg aagttattaa 100

15

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

25 <400> 22

ctttgaaaaa ttgcatcca g

21

<210> 23

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 23

agacgaatac ttcaataatt taactttcca atatgaagaa cccgataacc aaacagacaa 60
10 cgactaaacc gacttagata atacitttta aactcttctc 100

<210> 24

<211> 21

15 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

20

<400> 24

agacgaatac ttcaataatt t 21

25 <210> 25

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 25

5 tatgaaaaat ttgagaagag ttcattcaat ttctactatg attaaagggt tgtatggat 60
taaagaagat gttttttgt ctgttccatg tattttgggt 100

<210> 26

10 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 26

atgaaaaatt tgagaagagt 20

20

<210> 27

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 27

gacaaggtac ataaaaccca gttttacat aaagactaca acaatttcaa tgaaactgag 60
tacttttct tcgaacaaac ttttttagac gactatgaaa 100

5 <210> 28
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 28
gacaaggtac ataaaaccca g 21

15

<210> 29
<211> 60
<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:primer

25 <400> 29
aaaaaatctg ctgatacttt gtggggtatt caaaaagaat tgcaatttta ataactcgag 60

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 <220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 30

aaaaaatctg ctgatacttt g

21

10

<210> 31

<211> 52

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

20 <400> 31

acgttaaaat tattgagctc gaaccaactt gtgcaacggt tccgaattca ct

52

<210> 32

25 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 32

acgttaaaat tattgagctc g

21

5

<210> 33

<211> 31

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

15 <400> 33

atatatggat ccgcgtttat ttacctatct c

31

<210> 34

20 <211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

25 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 34

atatatgaat tctttgattg atttgactgt g

31

<210> 35

<211> 34

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

10 <400> 35

atatatctcg aggccagcta acttcttggt cgac

34

<210> 36

15 <211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 36

atatatgaat tctttgatgg atttgactgt g

31

25

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

5 <400> 37

tggttgatgt tatggaagat

20

<210> 38

10 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 38

gacaaggtac ataaaaccca g

21

20

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 39

gtaataaaca caccgccg

19

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/02833

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/14, C12P7/50, C12N1/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N9/14, C12P7/50, C12N1/15

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/MEBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/Geneseq,
MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---------------|--|----------------------------|
| <u>X</u> Y | Porro, D. et al., "Development of metabolocally engineered Saccharomyces cerevisiae cells for the production of lacticacid", Biotechnol.Prog., (1995), Vol.11, pages 294 to 298, abstract; Fig. 5; page 294, right column, Par. No. [0002]; page 296, left column, line 26 to right column, line 3 | <u>1-7, 18, 19</u> 8-17 |
| Y | Kellermann, E. et al., "Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDS1) from Saccharomyces cerevisiae", Nucleic Acids Res., (1986), Vol.14, No.22, pages 8963 to 8977, full text | 8-17 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
20 May, 2003 (20.05.03)

Date of mailing of the international search report
03 June, 2003 (03.06.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02833

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|----------------------------|
| X Y | ADACHI, E. et al., "Modification of metabolic pathways of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value", <i>Journal of Fermentation and Bioengineering</i> , (1998), Vol.86, No.3, pages 284 to 289, abstract; Figs. 6, 7 | <u>1-7, 18, 19</u> 8-17 |
| Y | Bloxham, D.P., "Modification of pig heart lactate dehydrogenase with methyl methanethiosulphonate to produce an enzyme with altered catalytic activity", <i>Biochemical Journal</i> , (1977), Vol.161, No.3, pages 643 to 651, page 645, right column, Par. No. [0003] | 1, 2, 6-19 |
| A | ISHIGURO, N. et al., "Primary structure of bovine lactate dehydrogenase-A isozyme and its synthesis in <i>Escherichiacol</i> ", <i>Gene</i> , (1990), Vol.91, pages 281 to 285, Fig. 1 | 3-5 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/53, C12N9/14, C12P7/50, C12N1/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/53, C12N9/14, C12P7/50, C12N1/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/Geneseq

MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|----------------------------|
| <u>X</u> Y | Porro, D. et al., "Development of metabolically engineered <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cells for the production of lactic acid" Biotechnol. Prog., (1995), Vol.11, pp.294-298, 要約, Fig. 5, 第294頁右欄第2段落及び第296頁左欄第26行-右欄第3行参照 | <u>1-7, 18, 19</u> 8-17 |
| Y | Kellermann, E. et al., "Analysis of the primary structure and promoter function of a pyruvate decarboxylase gene (PDC1) from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> " Nucleic Acids Res., (1986), Vol.14, No.22, pp.8963-8977, 全文参照 | 8-17 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20.05.03

国際調査報告の発送日

03.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新留 豊



4B

9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|----------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X Y | Adachi, E. et al., "Modification of metabolic pathways of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value" <i>Journal of Fermentation and Bioengineering</i> , (1998), Vol. 86, No. 3, pp. 284-289, 要約及びFig. 6, 7参照 | <u>1-7, 18, 19</u> 8-17 |
| Y | Bloxham, D.P., "Modification of pig heart lactate dehydrogenase with methyl methanethiosulphonate to produce an enzyme with altered catalytic activity" <i>Biochemical Journal</i> , (1977) Vol. 161, No. 3, pp. 643-651, 第645頁右欄第3段落参照 | 1, 2, 6-19 |
| A | Ishiguro, N. et al., "Primary structure of bovine lactate dehydrogenase-A isozyme and its synthesis in <i>Escherichia coli</i> " <i>Gene</i> , (1990), Vol. 91, pp. 281-285, Fig. 1参照 | 3-5 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.